

Amanda Massucatto

Influência do copépodo *Acartia* sp. e uso de probiótico nos estágios iniciais de cultivo do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Dr^a. Mônica Yumi Tsuzuki
Coorientadora: Dr^a. Ana Silvia Pedrazzani

Florianópolis/SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Massucatto, Amanda

Influência do copépodo *Acartia* sp. e uso de probiótico nos estágios iniciais de cultivo do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* / Amanda Massucatto ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki ; coorientadora, Ana Silvia Pedrazzani. - Florianópolis, SC, 2016.

60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Microbiologia. 3. Nutrição. 4. Peixe ornamental. 5. Sanidade. I. Tsuzuki, Mônica Yumi . II. Pedrazzani, Ana Silvia . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Influência do copépodo *Acartia* sp. e uso de probiótico nos estágios iniciais de cultivo do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*

Por

AMANDA MASSUCATTO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

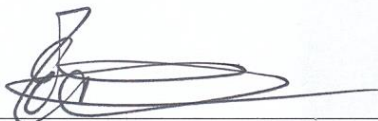
MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.




Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

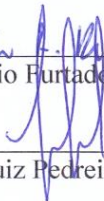
Banca Examinadora:



Dr. Evoy Zaniboni Filho – *Presidente*



Dr. Flávio Furtado Ribeiro - UFSC



Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UFSC



Dra. Márcia Vanacor Barroso - INCAPER

Dedicado este trabalho aos meus queridos pais e ao Guilherme, que sempre me apoiaram em todas as decisões.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que me auxiliaram de forma direta e indireta nesses últimos dois anos. Cada pessoa que conheci, cada conversa e instante vivido colaboraram nesta etapa.

À minha orientadora, Professora Mônica, pela paciência, ensinamentos, por acreditar no meu trabalho e me permitir fazer parte da equipe LAPOM.

À minha coorientadora Ana Silva, agradeço imensamente por todo apoio, por estar sempre disposta a ajudar, orientar e discutir minhas inúmeras dúvidas.

Aos colegas de laboratório, Renata, Daner, Lucas, Wesley, Ilson, Néa, Mateus, Bruninha, Gigi, Yuri, Maik, que deixaram nossos cafés mais divertidos e garantiram no trabalho, quando foi necessário. Ao Rafael, pelo auxílio com as análises estatística, e à Sassá, pelo doce de pessoa além do cafézinho inigualável, o meu muito obrigada!

Aos meus queridos amigos, Douglas, Raoani, Sarinha, pelas conversar, desabafos, alegrias compartilhadas e por estarem sempre ao meu lado. Em especial à Paulinha, por todo amor e amizade que vem de outras vidas.

Ao Laboratório de Bioquímica (UFSC), principalmente ao Professor Carlos, que me cedeu espaço para as análises enzimáticas, além de contribuir com seu conhecimento e disposição em ensinar. Agradeço também a Dani e a Cris que me ensinaram e ajudaram com às análises, além dos momentos de descontração.

Ao pessoal do LAPMAR, sempre muito solícitos, especialmente à Cris, que não mediu esforços em qualquer que fosse a necessidade, principalmente em relação ao alimento vivo.

Ao pessoal do LCM, por ajudarem sempre que puderam, seja com as PLs ou com a disponibilidade para as análises.

Ao LMM, pelo fornecimento das microalgas utilizadas nos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC, especialmente ao Carlito, muito atencioso e disposto a ajudar, com a eficiência e alegria de sempre. À CAPES pela bolsa de estudos concedida durante esse período.

Ao Guilherme, por todo amor, por me entender como ninguém, pela paciência durante essa etapa e por me transmitir paz. Nossa parceria é o que me fortalece a cada dia. Obrigada por tudo!

E aos meus pais, meu porto seguro, sou muito grata por todo amor, torcida, confiança, por me guiarem sempre desejando o melhor. Amo vocês!

RESUMO

A fase de larvicultura é o principal gargalo para o cultivo de cavalos-marinhos, devido à elevadas taxas de mortalidade associadas à alimentação e às doenças. O estudo objetivou avaliar diferentes dietas combinadas ao uso de um probiótico comercial na larvicultura do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*. Foram testadas seis tratamentos: *Artemia* sp. (A); rotíferos *Brachionus* sp. + *Artemia* sp. (RA); copépodes coletados *Acartia* sp. + rotíferos + *Artemia* sp. (CRA), e os mesmos tratamentos com a adição de probiótico comercial AquaStar® Hatchery (A-P, RA-P e CRA-P) ($0,005 \text{ g L}^{-1}$) na água dos tanques. Aos 13 DAN (Dias Após Nascimento), maiores taxas de sobrevivência foram observadas nos tratamentos CRA (88,12%) e CRA-P (86,38 %). O tratamento A-P teve uma sobrevivência de apenas 3,48%, enquanto no tratamento A, as larvas apresentaram mortalidade total no oitavo DAN. Aos 13 DAN, o peso das larvas dos tratamentos CRA e CRA-P ($31,37 \pm 10,41$ e $38,63 \pm 15,89 \text{ mg}$, respectivamente) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos demais tratamentos (A-P: $18,08 \pm 8,16$; RA: $7,05 \pm 3,63$ e RA-P: $9,05 \pm 5,09 \text{ mg}$). A altura e o comprimento total (CT), também foram maiores nos tratamentos CRA e CRA-P (Altura: $1,76 \pm 0,25$ e $1,97 \pm 0,33 \text{ cm}$; CT: $2,25 \pm 0,29$ e $2,52 \pm 0,40 \text{ cm}$, respectivamente), ainda que o tratamento CRA-P tenha apresentado melhor desempenho ($p < 0,001$) devido a adição de probiótico na água. Estes resultados apontam a importância de copépodes calanóides como alimento complementar para dietas tradicionais à base de rotíferos e artêmia. Por esse motivo, o efeito do probiótico nas contagens bacterianas (bactérias heterotróficas, *Vibrio* spp. e bactérias lácticas) e na atividade de enzimas digestivas (proteases e amilase) foi avaliado apenas nos tratamentos CRA e CRA-P com 16 DAN. Não foram detectadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nestas análises, mesmo que numericamente os valores tenham sido superiores nos tratamentos com probiótico. Porém, nesta mesma idade (16 DAN), o tratamento CRA-P apresentou melhor desempenho em todas variáveis de crescimento (peso: $80,37 \pm 21,57 \text{ mg}$, altura: $2,74 \pm 0,23$ e CT: $3,46 \pm 0,28 \text{ cm}$) quando comparado ao CRA (peso: $71,16 \pm 26,21 \text{ mg}$, altura: $2,59 \pm 0,26$ e CT: $3,27 \pm 0,33 \text{ cm}$). A partir dos resultados obtidos, sugere-se que uma dieta complementada com copépodes associada à adição de probiótico comercial durante a fase de larvicultura pode proporcionar efeitos benéficos ao *H. reidi*, pois de forma indireta houve uma associação de sua utilização ao bom desempenho das larvas de cavalos-marinhos.

Palavras-chave: 1.Aquicultura. 2.Microbiologia. 3.Nutrição. 4.Peixe ornamental. 5.Sanidade.

ABSTRACT

The larviculture is one of the main bottlenecks for seahorse production due to high mortality rates related to nutrition deficiency and diseases. This study evaluated different diets combined with the use of a commercial probiotic in the larviculture of the seahorse *Hippocampus reidi*. Six treatments were tested in triplicate: *Artemia* sp. (A); rotifers *Brachionus* sp. + *Artemia* sp. (RA); wild copepods, mainly *Acartia* sp. + rotifers + *Artemia* sp. (CRA), and the same treatments with a commercial probiotic AquaStar® Hatchery (A-P, RA-P e CRA-P) (0.005 g L⁻¹) added in the rearing water. At 13 DAB (Days After Birth), higher survival rates were observed in the CRA (88.12%) and CRA-P (86.38 %) treatments. Survival in the A-P treatment was only 3.48%, while in the A treatment, all larvae died at the 8 DAB. At 13 DAB, larval weight in the CRA and CRA-P treatments (31.37 ± 10.41 and 15.89 ± 38.63 mg, respectively) was significantly superior ($p < 0.05$) compared to other treatments (A-P: 18.08 ± 8.16; RA: 7.05 ± 3.63 and RA-P: 9.05 ± 5.09 mg). The height and the total length (TL) were highest in CRA and CRA-P treatments (height: 1.76 ± 0.25 and 1.97 ± 0.33 cm, TL: 2.25 ± 0.29 and 2.52 ± 0.40 cm, respectively), although the CRA-P treatment showed better performance ($p < 0.001$) due to the addition of probiotic in water. These results demonstrate the importance of calanoid copepods as a complementary food for traditional diets based on rotifers and *Artemia* sp. Because of these results, the effect of probiotic in bacterial counts (heterotrophic bacteria, *Vibrio* sp. and lactic acid bacteria) and in the activity of digestive enzymes (protease and amylase) has been evaluated only in CRA and CRA-P treatments at 16 DAB. No significant differences were detected ($p > 0.05$) in these analyzes, even though the numerical values were higher in the treatments with probiotics. However, at this same age (16 DAB), CRA-P treatment showed better performance in all growth variables (weight: 80.37 ± 21.57 mg, height: 2.74 ± 0.23 and TL: 3.46 ± 0.28 cm) when compared to the CRA (weight: 71.16 ± 26.21 mg, height: 2.59 ± 0.26 and TL: 3.27 ± 0.33 cm). From the results obtained here, it is suggested that the diet supplemented with copepods associated with the addition of commercial probiotic during the hatchery stage may be beneficial to *H. reidi* as indirectly there was an association between its use with good performance of seahorses larvae.

Keywords: 1.Aquaculture. 2.Microbiology. 3.Health. 4.Nutrition. 5.Ornamental fish.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1.1 Cavalos-marinhos	15
1.1.2 Comércio de cavalos-marinhos	16
1.1.3 Limitações para o cultivo de cavalos-marinhos	17
<i>1.1.3.1 Alimentação</i>	17
<i>1.1.3.1 Doenças</i>	20
1.1.4 Uso de probiótico na aquicultura	21
1.2 OBJETIVO GERAL	23
1.2.1 Objetivos Específicos	23
2. ARTIGO CIENTÍFICO:	25
RESUMO	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
Origem e manutenção dos reprodutores	29
Alimento vivo	29
Desenho e condições experimentais	30
Avaliação dos índices zootécnicos	32
Avaliação microbiológica	33
Atividade enzimática	33
Proteases	34
Amilase	34
Análise Estatística	35
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS	45
3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	53

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Cavalos-marinhos

A família Syngnathidae, compreende 52 gêneros de peixes, dentre eles estão os cavalos-marinhos, os dragões-marinhos, os peixes-cachimbo e os cavalos-cachimbo (NELSON, 2006). Todas as espécies de cavalos-marinhos estão incluídas em um único gênero, o *Hippocampus*. Sua distribuição se estende entre as latitudes 50° N e 50° S em todo o mundo (LOURIE et al., 1999, 2004), com predominância em águas litorâneas rasas (<30 m de profundidade) de regiões tropicais e temperadas, habitando bancos de fanerógamas marinhas, manguezais, estuários ou formações recifais (VINCENT, 1996; LOURIE et al., 1999), ainda que muitas espécies já foram encontrados entre 40 a 100 m de profundidade (FOSTER e VINCENT, 2004).

Várias características morfológicas do grupo são praticamente as mesmas em relação ao corpo e às funções básicas: a cabeça formando um ângulo reto em relação ao corpo ereto, olhos que se movem de forma independente, um longo focinho tubular sem dentes que suga os alimentos, um trato digestório sem estômago diferenciado (STOSKOPF, 1993), a pele esticada sobre uma série de anéis ósseos ao redor do tronco e da cauda e a adaptação da barbatana caudal em uma cauda preênsil (FOSTER e VINCENT, 2004). Estes animais também apresentam excelente capacidade de camuflagem desenvolvida através de filamentos dérmicos, eles permanecem praticamente imóveis durante grande parte do tempo, podendo alterar o padrão de coloração ao longo de alguns dias ou semanas, coincidindo melhor com o habitat em que se encontram (LOURIE et al., 2004).

Os cavalos-marinhos são predadores de emboscada, e consomem principalmente presas vivas e móveis por sucção (BERGERT e WAINWRIGHT, 1997). Eles esperam até que a presa se aproxime da boca, depois projetam o focinho com uma ingestão rápida de água para captura (FOSTER e VINCENT, 2004). Os olhos movem-se independentemente um do outro, permitindo que o animal maximize a sua área de pesquisa e/ou monitore o ambiente (OCKEN, 1994). Na natureza, assim que as larvas nascem, já estão preparados para alimentação exógena, que é basicamente composta por copépodes e copepoditos, porém ao longo do seu crescimento a dieta vai sendo alterada, assim, conforme aumentam de tamanho, passam a ingerir presas maiores, como

pequenos camarões carídeos, misidáceos e nemátodos (KENDRICK e HYNDES, 2005; CASTRO et al., 2008).

No Brasil, três espécies de cavalos-marinhos são encontradas, *Hippocampus erectus*, *Hippocampus reidi* e recentemente o *Hippocampus patagonicus* (SILVEIRA et al., 2014), sendo *H. reidi* encontrada em maior abundância (CORRÊA et al., 2011). Sua distribuição é restrita à costa oeste dos Estados Unidos até o Rio de Grande do Sul no Brasil (OBIS, 2016) e pode ser encontrada perto da superfície (ROSA et al., 2005) ou até 55 m de profundidade (LOURIE et al., 1999). Assim como outras espécies de cavalos-marinhos, *H. reidi* apresenta pouca mobilidade, pequena abrangência territorial e fidelidade entre parceiros (FOSTER e VINCENT, 2004; ROSA et al., 2005).

1.1.2 Comércio de cavalos-marinhos

O comércio de cavalos-marinhos movimentam um mercado do qual participam pelo menos 46 países exportadores (CITES, 2010), em torno de 15 a 20 milhões de indivíduos são comercializados anualmente, sendo que a maioria são extraídos do ambiente natural (PROJECT SEAHORSE, 2006). Os animais são vendidos vivos, atendendo a indústria de peixes ornamentais, ou secos, sendo destinados à medicina tradicional, principalmente a chinesa (VINCENT, 1996).

O Brasil abriga um comércio interno de animais secos, que são vendidos como souvenirs, além de ser considerado um grande exportador de animais vivos (VINCENT, 1996b; ROSA et al., 2005). O país iniciou sua atividade em 1990 e no início da década de 2000 foi considerado um dos principais exportadores de cavalos-marinhos vivos do mundo e o maior da América Latina, comercializando milhares de indivíduos por ano, principalmente para a Europa e para os Estados Unidos (BAUM e VICENT, 2005), sendo o *H. reidi* considerado o principal alvo do mercado de aquarofilia (BULL, 2002). Segundo o IBAMA, em 2006 e 2007, o país exportou 1.517 e 2.745 cavalos-marinhos, respectivamente. Entretanto, para o mercado interno, a captura não é regulamentada ou se quer controlada, inexistindo dados sobre a captura para a distribuição dentro do país.

Por outro lado, os cavalos-marinhos apresentam forte apelo popular no que tange ao suporte à sua conservação marinha e ao seu manejo sustentável (SREEPADA, DESAI e NAIK, 2002). Como consequência da degradação de seus habitats naturais, da captura incidental em aparelhos de pesca (*bycatch*), da sobre-exploração para o comércio, aliados a restrita capacidade de deslocamento e consequente

difficuldade de recolonizar áreas fragmentadas, as populações de cavalos-marinhos estão globalmente ameaçadas (LOURIE et al., 2004; FOSTER e VICENT, 2004; ROSA et al., 2005). A partir da Instrução Normativa Nº 202, de 22 de outubro de 2008, as exportações passaram a ser regulamentadas, sendo estabelecidas cotas anuais de captura e exportação concedidas a empresas ou associações de pescadores. Esta medida pôde ser aplicada somente após a inclusão do *H. reidi* no Anexo II da lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação em 2004 (Instrução Normativa MMA n.5, 2004). Recentemente, as três espécies de *Hippocampus* nativas do Brasil foram inseridas no Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Ambientes Coralíneos, o Pan Corais, que estabelece de acordo com a Portaria nº 19, de 9 de março de 2016 estratégias prioritárias de conservação para espécies de peixes e invertebrados aquáticos consideradas ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2016).

Diante da crescente demanda de cavalos-marinhos para o comércio de aquariofilia ou para a medicina e a gastronomia, a aquicultura surge como uma alternativa sustentável e economicamente viável para o abastecimento do mercado, sendo que ao longo dos últimos anos, o interesse por esta atividade vem aumentando (OLIVOTTO, 2011).

1.1.3 Limitações para o cultivo de cavalos-marinhos

1.1.3.1 Alimentação

A produção de cavalos-marinhos é geralmente realizada em sistemas fechados de cultivo, intensivo ou semi-intensivo, os quais exigem alto investimento e constante suprimento de alimento vivo ou fresco (crustáceos, larvas de peixes e zooplâncton), pois cavalos-marinhos não aceitam alimento seco (ROSA et al., 2005). Desta forma, a alimentação é considerada um dos principais entraves do cultivo de *H. reidi*, pois não se tem conhecimento da dieta mais adequada tanto para reprodutores quanto para filhotes (FELÍCIO et. al., 2006; KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010).

As larvas geralmente são capazes de se alimentar no dia em que são liberadas da bolsa do macho, alimentando-se exclusivamente de presas vivas, necessitando, portanto, que este alimento seja cultivado em laboratório e ou coletado no meio ambiente. Porém, uma das principais limitações é a baixa sobrevivência das larvas nos primeiros dias de vida, isso provavelmente ocorre devido à inadequação nutricional, além do tipo e tamanho do primeiro alimento disponível nos cultivos intensivos

(PAYNE e RIPPINGALE, 2000; LIN et al., 2007; OLIVOTTO et al., 2008).

Rotíferos (*Brachionus* sp.) e náuplios de *Artemia* sp. são comumente utilizados na piscicultura marinha como presas vivas, uma vez que podem ser facilmente produzidos em grandes quantidades (JOB et al., 1997; HOLT, 2003; FOSTER e VINCENT, 2004; HOFF e SNELL, 2008). Alguns autores relatam que filhotes de algumas espécies de cavalos-marinhos podem ser cultivados apenas com a utilização de *Artemia* sp., tais como *Hippocampus abdominalis* (WOODS, 2003; MARTINEZ-CARDENAS e PURSER, 2007), *Hippocampus hippocampus* (LENOIR et al., 2008) e *Hippocampus withei* (WONG e BENZIE, 2003). Entretanto, o uso exclusivo de artêmia nos primeiros dias de vida dos cavalos-marinhos, considerados os mais críticos, nem sempre promovem uma boa sobrevivência, visto que podem não fornecer a quantidade de nutrientes necessária, ou em alguns casos, apresentam tamanho inadequado para sua apreensão (PAYNE e RIPPINGALE, 2000; OLIVOTTO et al., 2006; LIN et al., 2007). Outro aspecto que dificulta o manejo alimentar do *H. reidi* é a aparente ausência de estômago da espécie (RODRIGUES-NETO, 2000), impedindo a digestão de alguns alimentos. Payne e Rippingale (2000) utilizando *Artemia* sp. enriquecida na dieta de recém-nascidos de *Hippocampus subelongatus* observaram que a maioria dos animais morreram em até cinco dias de vida. A posterior constatação da presença de *Artemia* sp. intacta nas fezes, indicou a incapacidade de digestão, e consequente desnutrição, como a causa *mortis* dos animais.

Wittenrich (2007) recomenda que a alimentação inicial do *H. reidi* deve ser composta de presas menores, como rotíferos e/ou copépodes, pois estes animais apresentam tamanho relativamente pequeno quando comparados a outras espécies de cavalos-marinhos, como o *Hippocampus erectus*, *Hippocampus zosterae* e *Hippocampus guttulatus*, que ao nascerem são grandes o suficiente para consumirem presas maiores, como náuplios de artêmia (LIN et al., 2008; PALMA et al., 2011). Porém, os rotíferos nem sempre são considerados uma boa opção. Hora (2015) mostrou que o uso exclusivo de rotíferos *Brachionus* sp. como alimento para larvas de *H. reidi* produziu resultados insatisfatórios quanto a sobrevivência, de apenas 50% após 12 dias de experimento, decorrente da baixa qualidade nutricional para esta espécie. Willadino et al. (2012) ao avaliarem a taxa de ingestão, sobrevivência e crescimento de recém-nascidos de *H. reidi* alimentados com diferentes presas vivas, constataram em um dos tratamentos que nenhum ou muito poucos rotíferos foram ingeridos, resultando em uma sobrevivência após 14 dias de apenas 0,3%,

o que sugere que eles não podem ser considerados um alimento vivo adequado para os recém-nascidos. Assim, fontes alternativas de presas vivas para substituição de rotíferos e náuplios de *Artemia* sp. tornam-se necessárias para aumentar a sobrevivência durante a larvicultura destes peixes (OLIVOTTO et al., 2006).

O uso de copépodes como único alimento ou como complemento alimentar, têm sido indicado para otimizar a criação de cavalos-marinhos nas fases iniciais de larvicultura, provavelmente devido à uma maior capacidade de digestão pelas larvas de cavalos-marinhos (PAYNE e RIPPINGALE, 2000; SHENG et al., 2006; OLIVOTTO et al., 2008), uma vez que copépodes compõe o principal alimento no ambiente natural (PAYNE e RIPPINDALE, 2000). Várias espécies de copépodes foram testadas na produção de cavalos-marinhos, como *Tisbe* sp. (OLIVOTTO et al., 2008; WILLADINO et al., 2012; SOUZA-SANTOS et al., 2013), *Pseudodiaptomus annandalei* (SHENG et al., 2006; CELINO et al., 2012), *Acartia tsuensis* (CELINO et al., 2012) e copépodes selvagens (JOB et al., 2006; HORA e JOYEUX, 2009; PHAM e LIN, 2013). Contudo, melhores resultados têm sido obtidos com o uso de copépodes calanóides em relação aos herpacticóides, uma vez que apresentam todas as fases de vida pelágicas, tornando-os mais fáceis de serem predados (PAYNE e RIPPINGALE, 2000; OLIVOTTO et al., 2008; 2009). As vantagens do uso deste tipo de alimento foram comprovadas pois além do seu elevado valor nutritivo, apresentam grande variação de tamanho e de natação, fato que promove estímulos visuais às larvas de peixes (BARROSO et al., 2013; VU et al., 2014). Copépodes são naturalmente ricos em ácidos graxos altamente insaturados (HUFA's), principalmente, ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA), ambos essenciais para os primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes marinhos (SARGENT et al., 1997). Além disso são considerados importante fonte de enzimas digestivas exógenas, sendo importantes para a digestão das larvas (MUNILLA-MORAN et al., 1990).

O uso de copépodes selvagens já é empregado com sucesso na primeira alimentação em cultivo comercial e proporciona uma boa sobrevivência (>85%) e crescimento para larvas de *H. reidi* (HORA e JOYEUX, 2009, 2010). No entanto, apesar dos benefícios nutricionais que apresenta, o alimento vivo coletado no ambiente natural pode introduzir patógenos e ou outros organismos indesejáveis no sistema de cultivo (BURHANS e MELECHINSKY, 2000). Considerando esses fatores, faz-se necessária a associação de alimento de qualidade com técnicas de manejo, a fim de assegurar a saúde e a nutrição adequada dos filhotes de cavalos-marinhos.

1.1.3.1 Doenças

Além da dificuldade da alimentação dos cavalos-marinhos em cativeiro (CASTRO et al., 2008), estes peixes são especialmente vulneráveis à doenças e infecções durante suas primeiras semanas de vida (WILSON e VINCENT, 1998; WOODS, 2000, KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010). Fatores como altas densidades de estocagem, níveis de estresse elevados, dietas inadequadas ou qualquer outra condição de cultivo imprópria, podem sinergicamente predispor mortalidade significativa (JENNINGS et al., 2001). Por exemplo, Hora e Joyeux (2009) relataram que em um de seus estudos piloto com *H. reidi*, elevadas taxas de mortalidade ocorreram entre o 42° e 53° dia de cultivo, devido a um agente microbiano patogênico indeterminado.

Algumas doenças são comumente encontradas em cavalos-marinhos e podem estar relacionadas com infecções bacterianas, tais como exoftalmia (“pop eye”), doença da bolha de gás interno e externo, bolsa de enfisema, erosão da carne e podridão do focinho, estas duas últimas causadas por bactérias do gênero *Vibrio* (SEAHORSE, 2005). Vibrioses (ALCAIDE et al., 2001; BALCÁZAR et al., 2009; MARTINS et al., 2010) e micobacteriose (KOLDEWEY, 2005) são consideradas as principais doenças que acometem a produção de cavalos-marinhos. As vibrioses são normalmente encontradas no ambiente marinho e o surto das doenças está associado à exposição dos peixes a agentes infecciosos na presença de fatores estressantes, como baixa qualidade de água (AUSTIN e AUSTIN, 2007).

Martins et al. (2010) isolaram cepas de *V. alginolyticus* de um surto de enfermidade em cavalos-marinhos *H. reidi* e por meio de infecção experimental relataram patogenicidade para a espécie, devido a alta mortalidade ocorrida e lesões sobre a boca, guelras, fígado e rins. Visto que o *Vibrio* sp., pode apresentar alta resistência à maioria dos antibióticos disponíveis no mercado, tais como ampicilina, gentamicina, penicilina, entre outros (RAISSY et al., 2012), outras alternativas devem ser consideradas. Existem vacinas bivalentes e polivalentes que veem sendo estudadas, e embora tenham sido realizados testes eficazes com patógenos isolados para desafiar cavalos-marinhos vacinados, ainda há pouca informação científica acerca do assunto (KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010). Martins et al. (2010) ainda sugerem a utilização de imunostimulantes ou bactérias probióticas afim de minimizar a ocorrência de doenças.

1.1.4 Uso de probiótico na aquicultura

Após o início da utilização de micro-organismos em dietas para animais, o probiótico foi definido como “organismo ou substância que contribui para um balanço intestinal adequado” (PARKER et al., 1974). Mais tarde, Fuller (1989) modificou a definição para “micro-organismo vivo utilizado na alimentação que afeta benéficamente o animal hospedeiro por melhorar o balanço de micro-organismos da flora intestinal”. No entanto, essa definição parece ser insuficiente para a aquicultura, considerando que há uma constante interação entre os organismos cultivados e os micro-organismos presentes no ambiente aquático (BEZERRA, 2008). Considerando que os micro-organismos melhoravam de alguma forma o sistema de cultivo beneficiando a espécie cultivada, Verschuere et al. (2000) definiu probióticos como “micro-organismos vivos que ao serem ministrados a tanques de cultivo atuam benéficamente no organismo aquático de interesse, seja melhorando o consumo ou a absorção da ração, o sistema imunológico, balanço de bactérias no trato digestivo ou o ambiente de cultivo (viveiro)”. Esta definição não restringe a atuação do probiótico independente da sua via de aplicação, ou seja, podem ser administrados quer como um suplemento alimentar ou como um aditivo para água.

Recentemente, os probióticos têm sido cada vez mais utilizados na criação de animais, pelo fato de colonizarem o intestino, promovendo o balanço microbiano e exercendo efeitos benéficos no hospedeiro (MORELLI et al., 2003), agem desta forma como promotores de crescimento, proporcionando um aumento geral na produção e reduzindo a mortalidade causada por patógenos (VERSCHUERE et al., 2000; WANG, LI e LIN, 2008). Além disso, as bactérias probióticas podem participar nos processos de digestão do hospedeiro através da secreção de uma gama de enzimas digestivas relevantes (LAZADO et al., 2012), exercendo efeitos sinérgicos sobre a microbiota intestinal e a atividade microbiana, consequentemente aumentando (NAYAK, 2011) ou estimulando a produção de enzimas endógenos pelo hospedeiro (LAZADO et al., 2012).

Entre os mais variados tipos de probióticos utilizados na aquicultura, destacam-se os *Bacillus* sp. e as bactérias ácido-láticas. As bactérias do gênero *Bacillus* são gram-positivas, em formato de bastonetes, formadoras de esporos e são encontradas em diversos ambientes, como água, solo, poeira e ar (MADIGAN et al, 2002). Sua capacidade de esporulação facilita sua inclusão em dietas e produtos comerciais (OCHOA-SOLANO e OLMOS-SOTO, 2006). Além disso, os

Bacillus são capazes de reduzir a quantidade de patógenos presentes na água, pois secretam substâncias como toxinas, enzimas bacteriolíticas, substâncias antibióticas e bacteriocinas (SCHULZ, BONELLI e BATISTA, 2005), melhorando assim o ambiente de cultivo. Já as bactérias ácido-láticas são caracterizadas como gram-positivas, não esporuladas, cujo produto principal de sua fermentação é o ácido láctico. Estão normalmente presentes na microflora intestinal de peixes e produzem compostos antibacterianos que inibem o crescimento de bactérias patogênicas (FULLER, 1989).

Foram comprovadas melhoras no desempenho reprodutivo dos peixes ornamentais *Poecilia reticulata*, *Poecilia sphenops*, *Xiphophorus helleri* e *Xiphophorus maculatus* quando alimentados com ração suplementada com diferentes concentrações de *Bacillus subtilis* (GHOSH, SINHA e SAHU, 2007). Também constatou-se um aumento na produção de amilase, lipase e protease em tilápias *Oreochromis niloticus* alimentadas com dietas contendo *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* a uma concentração de 1×10^7 UFC g⁻¹ (ESSA et al., 2010). Suzer et al. (2008) utilizaram probiótico comercial (na água e no alimento vivo) contendo espécies de *Lactobacillus* sp. em cultivo de larvas do pargo europeu *Sparatus aurata* que resultou em um aumento das atividades de enzimas digestivas, melhorando a sobrevivência e o crescimento das larvas. Talpur et al. (2013) incrementaram *Lactobacillus plantarum* como aditivo da água na larvicultura do caranguejo *Portunus pelagicus* e constataram efeito integrado, com maior sobrevivência, atividade enzimática e redução da carga de *Vibrio* sp. em relação ao controle, determinando $5,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ como concentração mais efetiva. Por outro lado, Ziaei-Nejad et al. (2006) ofertaram artêmias suplementadas com $2,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ de probiótico comercial contendo *Bacillus* sp. para *Fenneropenaeus indicus*, e apesar do microcrustáceo ter sido uma via de administração eficaz do probiótico, a sobrevivência e o crescimento das larvas não apresentaram melhoras significativas.

Considerando que a baixa taxa de sobrevivência de cavalos-marinhos nos primeiros meses de vida tem sido um impedimento para pesquisadores e produtores comerciais (FORTEATH, 1996) e que isso pode estar relacionado tanto com a deficiência alimentar dos animais como ao aparecimento de doenças nos cultivos, são necessários estudos voltados ao desenvolvimento de tecnologias que assegurem uma alimentação adequada à manutenção desses animais. A inclusão de bactérias probióticas pode aumentar a eficiência alimentar, a digestibilidade das dietas, além de atuar na prevenção de doenças.

1.2 OBJETIVO GERAL

Melhorar a eficiência produtiva do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* nos estágios iniciais de vida, através da avaliação de diferentes dietas e da utilização de probiótico comercial na água de cultivo.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Comparar a eficiência de diferentes tipos de alimentos vivos no desempenho zootécnico de larvas de *H. reidi*;
- Avaliar o efeito do uso de um probiótico comercial no desempenho zootécnico de larvas de *H. reidi*;
- Verificar o efeito do probiótico na atividade de enzimas digestivas (proteases e amilases);
- Verificar através das contagens bacterianas, alterações na microbiota presente na água e nas larvas após o uso de probiótico no cultivo de *H. reidi*.

Este trabalho será submetido à revista científica Boletim do Instituto de Pesca e esta formatado conforme as normas da revista.

2. ARTIGO CIENTÍFICO:

INFLUÊNCIA DO COPÉPODE *Acartia* sp. E USO DE PROBIÓTICO NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE CULTIVO DO CAVALO-MARINHO *Hippocampus reidi*

Amanda MASSUCATTO¹, Ana Silvia PEDRAZZANI¹, Mônica Yumi TSUZUKI¹

¹Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), Departamento de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Rodovia Admar Gonzaga, 1346 – Itacorubi - Florianópolis - SC - CEP 88034-001- Brasil. Telefone +55 (48) 37214792. Email: amanda.mscto@hotmail.com; monica.tsuzuki@ufsc.br

RESUMO

A fase de larvicultura é o principal gargalo para o cultivo do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, resultando em elevadas taxas de mortalidade associadas à alimentação e às doenças. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes dietas combinadas ao uso de um probiótico comercial na larvicultura deste peixe a fim de minimizar perdas em estágios iniciais de desenvolvimento. Para isso foram testados seis tratamentos: *Artemia* sp. (A); copépodes coletados *Acartia* sp., rotíferos e *Artemia* sp (CRA) e rotíferos e *Artemia* sp (RA), além dos respectivos tratamentos com adição de probiótico comercial AquaStar[®] Hatchery na água dos tanques, (0,005 g L⁻¹): A-P, CRA-P e RA-P. A dieta CRA obteve melhores resultados de sobrevivência e crescimento quando comparados às outras dietas (A e RA), demonstrando o potencial de copépodes calanóides como importante alimento complementar para dietas tradicionais a base de rotíferos e artêmia. Por apresentarem resultados satisfatórios, o efeito do probiótico foi avaliado apenas nos tratamentos CRA e CRA-P. Não foram encontradas diferenças ($p>0,05$) nas contagens bacterianas (bactérias heterotróficas, *Vibrio* spp. e bactérias lácticas) e tampouco na atividade de enzimas digestivas (proteases e amilase), mesmo que numericamente os valores tenham sido maiores no tratamento CRA-P, entretanto o melhor desempenho de crescimento (peso, altura e comprimento total) foi obtido neste tratamento ($p<0,01$). Sugere-se que a escolha de uma dieta

apropriada associada à adição de probiótico comercial durante a fase de larvicultura pode proporcionar efeitos benéficos ao *H. reidi*, pois de forma indireta houve uma associação de sua utilização ao bom desempenho das larvas de cavalos-marinhos.

Palavras-chave: Microbiologia; Nutrição; Peixe ornamental; Sanidade.

ABSTRACT

The larviculture is one of the main bottlenecks of seahorse *Hippocampus reidi*, resulting in high mortality rates due to nutrition deficiency and diseases. The aim of this study was to evaluate the use of commercial probiotic associated to different diets, aiming to reduce losses in the initial developmental stages of *H. reidi*. Six different treatments were tested: *Artemia* sp. (A); rotifers and *Artemia* sp (RA); collected copepods *Acartia* sp., rotifers and *Artemia* sp. (CRA), besides the same treatments with the addition of the commercial probiotic AquaStar® Hatchery to the water (0.005 g L^{-1}): A-P, RA-P and CRA-P. The CRA diet showed better results ($p < 0.05$) for survival, weight and length rates when compared to A and RA diet. These data demonstrate the potential of calanoid copepods as an important complementary food for traditional diets based on rotifers and *Artemia* sp. Because of that, the effect of probiotic has been evaluated only in CRA and CRA-P with 16 DAB treatments, the latter being the best growth performance than the CRA ($p < 0.01$). However, no differences were found ($p > 0.05$) in bacterial counts (heterotrophic bacteria, *Vibrio* sp. and lactic acid bacteria) and either in the activity of digestive enzymes (protease and amylase), even if the numerical values were positive. The choice of a proper diet associated with the addition of commercial probiotic during the hatchery stage may be beneficial to *H. reidi* because indirectly there was an association between its use to the good performance of seahorses larvae.

Keywords: Microbiology; Health; Nutrition; Ornamental fish.

INTRODUÇÃO

A espécie de cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, pertencente à família Syngnathidae, é encontrada desde a costa oeste dos Estados Unidos até o Rio de Grande do Sul no Brasil (OBIS, 2016), sendo uma das

espécies mais procuradas e valorizadas para o mercado de aquarofilia mundial (BULL, 2002). No início da década de 2000, o Brasil foi considerado um dos principais exportadores de cavalos-marinhos vivos do mundo e o maior da América Latina, comercializando milhares de indivíduos por ano (BAUM e VICENT, 2005). Contudo, como consequência da sobre-exploração para o comércio, aliado à degradação de seus habitats naturais (FOSTER e VICENT, 2004; VINCENT et al. 2011), hoje o *H. reidi* está incluso como vulnerável na “Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção” (MMA, 2004), além de constar no Apêndice II da CITES (CITES, 2016) juntamente com as outras espécies de cavalos-marinhos.

O cultivo destes peixes pode auxiliar na conservação de populações e suprir as demandas de mercado (OLIVOTTO et al. 2011). Embora alguns estudos estejam sendo realizados para aprimorar técnicas de cultivo (CASTRO et al., 2008; HORA e JOYEUX, 2009; WILLADINO et al., 2012; SOUZA-SANTOS et al., 2013; NOVELLI et al., 2015; 2016), a nutrição nas fases iniciais é pouco compreendida e é considerada um ponto crucial no cultivo de cavalos-marinhos (VINCENT e KOLDEWEY, 2005; OLIVOTTO et al., 2008; KOLDEWEY e MARTIN-SMITH, 2010). Além da falta de conhecimento sobre uma alimentação adequada, os recém-nascidos de *H. reidi* apresentam tamanho relativamente pequeno e a fase pelágica estendida (WITTENRICH, 2007; HORA e JOYEUX, 2009; OLIVOTTO et al. 2011), do contrário, recém-nascidos de *Hippocampus erectus*, *Hippocampus zosterae* e *Hippocampus guttulatus* são grandes o suficiente para consumir náuplios de artêmia (WITTENRICH 2007; LIN et al., 2008; PALMA et al., 2011), desta forma, a alimentação inicial do *H. reidi* deve ser composta de presas menores, como rotíferos e/ou copépodes (WITTENRICH, 2007).

No dia do nascimento, os filhotes de cavalos-marinhos já são descritos como excelentes caçadores (VAN WASSENBERGH et al., 2009). A morfologia do sistema visual permite a identificação de presas com precisão, e por já apresentarem boca e ânus abertos, a alimentação passa imediatamente de endógena para exógena (NOVELLI et al., 2015). Na natureza, os filhotes alimentam-se principalmente de copépodes (PAYNE e RIPPINDALE, 2000). Os copépodes apresentam alto valor nutritivo, pois são naturalmente ricos em ácidos graxos altamente insaturados (HUFA's), além de apresentarem grande variação de tamanho e de natação, fato que promove estímulos visuais às larvas de peixes (BARROSO et al., 2013; VU et al., 2014).

Vários estudos mostram que *Hippocampus subelongatus* (PAYNE e RIPPINDALE, 2000), *Hippocampus kuda* (CELINO et al., 2012) e *H. reidi* (OLIVOTTO et al., 2008; WILLADINO et al., 2012) em suas fases iniciais de desenvolvimento quando alimentados com uma dieta com copépodes (cultivados ou selvagens) têm taxas de sobrevivência e crescimento significativamente mais altas do que quando alimentados com rotíferos e/ou artêmia. Da mesma forma, o cultivo de *H. reidi* com zooplâncton selvagem, tem mostrado taxas de sobrevivência mais elevadas (CARLOS et al., 2009; HORA e JOYEUX, 2009). Embora artêmia e rotíferos sejam os alimentos vivos mais comumente usados na cultura de diferentes espécies de peixes (HOFF e SNELL, 2008), incluindo cavalos-marinhos (KOLDEWEY e MARTIN SMITH, 2010), as exigências nutricionais de recém-nascidos de *H. reidi* nem sempre são supridas quando se alimentam dessas presas (PAYNE e RIPPINDALE, 2000; OLIVOTTO et al., 2008; BARROSO et al., 2013). Normalmente é observada uma alta mortalidade nos primeiros dias de vida (LIN et al., 2007) e os motivos para essa alta taxa de mortalidade ainda não foram elucidados, mas provavelmente estão relacionados a fatores nutricionais.

Além da dificuldade da alimentação destes animais em cativeiro, as infecções bacterianas também têm sido citadas como um grande obstáculo para produzir cavalos-marinhos (ALCAIDE et al., 2001; MARTINS et al., 2010; BALCÁZAR et al., 2009). Têm-se notado em condições de laboratório e na aquicultura, uma variedade de doenças relacionadas aos cavalos-marinhos (ARCARUIBAL e SAINSBURY, 2005), mas as principais, causadoras de grandes perdas econômicas são as vibrioses (ALCAIDE et al., 2001) e as micobacterioses (KOLDEWEY, 2005). As vibrioses são normalmente encontradas no ambiente marinho e o surto das doenças está associado à exposição dos peixes a agentes infecciosos na presença de fatores estressantes (AUSTIN e AUSTIN, 2007).

O probiótico vêm sendo utilizado há bastante tempo na aquicultura e pode ser considerado uma alternativa para melhorar a saúde e a resistência às doenças, além do seu potencial em alcançar um melhor desempenho zootécnico em peixes. O probiótico é um suplemento alimentar microbiano vivo ou cultivado que beneficia o hospedeiro pela melhoria dos micro-organismos associados ou da comunidade microbiana presente no ambiente (IRIANTO e AUSTIN, 2002). Tem sido descrito que probióticos melhoram as funções digestivas, auxiliando na eficiência de conversão alimentar e no ganho de peso vivo (AL-DOHAIL, HASHIM e ALIYU-PAIKO, 2009), também conferem proteção contra patógenos por exclusão competitiva (VINE et al., 2004; CHABRILLON et al., 2005)

e ainda modulam respostas fisiológicas e imunológicas em peixes (KHATTAB et al., 2004; BALCAZAR et al., 2006).

Considerando que a baixa taxa de sobrevivência das larvas nas primeiras semanas de vida tem sido um impedimento para pesquisadores e produtores comerciais (FORTEATH, 1996) para o cultivo comercial da espécie, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso de probiótico comercial associado às diferentes dietas, com intuito de melhorar a eficiência produtiva do cavalo-marinho *H. reidi* nos estágios iniciais de vida.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e manutenção dos reprodutores

Adultos de cavalos-marinhos *Hippocampus reidi* foram coletados em Guarapari, Espírito Santo (autorização SISBIO/ICMBio n° 46575-5) e enviados para Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA – UFSC), localizado no município de Florianópolis.

No laboratório, nove casais de reprodutores foram formados e mantidos em aquários de 90 litros, ligados a um sistema de recirculação de água com uma caixa SUMP, contendo “skimmer”, filtro germicida UV, biofiltro de cerâmica e filtro mecânico “bag”. Foram mantidos em fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas escuro, temperatura de $24,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (média \pm desvio padrão), salinidade de $23,0 \pm 2,0$ e pH $8,0 \pm 0,5$. O nitrito e a amônia total permaneceram abaixo de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$.

Os reprodutores eram alimentados duas vezes ao dia com uma dieta constituída de pós-larvas (PL 20) de camarão *Litopenaeus vannamei* cultivado, ofertada na quantidade total de 20 PLs (dividido em duas refeições) por reprodutor. Uma vez ao dia, as pós-larvas eram embebidas durante 30 min em uma mistura de 1:1 do enriquecedor Red Pepper/Bernaqua e a dieta líquida Epilite-Z/Epicore, ambos ricos em ácidos graxos, antes de serem ofertadas. Os aquários eram sifonados antes da alimentação para remoção de restos de alimentos e excrementos.

Em média, cada casal paria duas vezes por mês, com intervalo de parto de aproximadamente 13 dias. Os recém-nascidos provenientes de três casais foram utilizados para realização dos experimentos.

Alimento vivo

As culturas de rotífero *Brachionus plicatilis* utilizadas no experimento foram mantidas em tanques de 500 L a $26\text{-}28^{\circ}\text{C}$ de

temperatura e 25 de salinidade, alimentados com Sparkle, conforme instruções do fabricante (Inve®, Bélgica) e com trocas de água realizadas duas vezes por semana. Foram fornecidos volumes da cultura filtrados em malha de 60 μm para remoção de detritos.

Para eclosão da *Artemia* sp., em torno de 1 a 2 g de cistos (High 5 – INVE) foram incubados em cones de 1 L de água a 25-30 de salinidade para que eclodissem após 24 h sob luz e forte aeração. Os náuplios recém-eclodidos foram filtrados em malha de 200 μm e lavados em água salgada, para posteriormente serem utilizados no experimento.

A coleta dos copépodes foi realizada diariamente em um tanque escavado com abastecimento de água natural proveniente da Lagoa da Conceição, Florianópolis, com o uso de rede coletora de plâncton com abertura de malha de 200 μm e 100 μm no copo coletor. Após a captura, o conteúdo da coleta era lavado e filtrado em malha de 500 μm para remoção de organismos maiores e resíduos de matéria orgânica e posteriormente em malha de 120 μm . O material retido era triado e identificado utilizando um microscópio, isolando assim os copépodes *Acartia* sp. que seriam utilizados no experimento.

Desenho e condições experimentais

Para a execução do experimento, foram fornecidas às larvas três diferentes dietas com e sem a adição de probiótico comercial na água dos aquários durante 13 dias, totalizando assim seis tratamentos em triplicada. Dois tratamentos (CRA e CRA-P) foram conduzidos por mais três dias.

O tratamento 1 (A), consistiu apenas na oferta de náuplios de *Artemia* sp. como alimento. No tratamento 2 (A-P), também foram alimentados somente com náuplios de *Artemia* sp. e foi adicionado diariamente o probiótico comercial diluído diretamente na água dos aquários. No tratamento 3 (CRA), os animais foram alimentados com rotíferos (durante os cinco primeiros DAN), náuplios de *Artemia* sp. (do 3° ao 16° DAN) acrescidos do copépode *Acartia* sp. (durante todo o experimento - 0 ao 16° DAN). Para o tratamento 4 (CRA-P), foi utilizada a mesma dieta do tratamento 3 com adição do probiótico na água. No tratamento 5 (RA), as larvas foram alimentados com rotíferos e náuplios de *Artemia* sp. No tratamento 6 (RA-P) foi utilizada a mesma dieta anterior (RA), porém com probiótico diluído diretamente na água uma vez ao dia (Tabela 1).

Os filhotes foram alimentados duas vezes ao dia. A transição das presas rotíferos e *Artemia* sp. nos tratamentos RA e RA-P ocorreu de forma gradual, sendo ofertado 100% de rotíferos no primeiro e segundo

dia, 75% de rotíferos e 25% de *Artemia* sp. no terceiro dia, 50% de cada presa no quarto dia, 25% de rotíferos e 75% de *Artemia* sp. no quinto dia e 100% de *Artemia* sp. a partir do sexto dia até o fim do experimento. Nos tratamentos CRA a CRA-P a transição dessas presas ocorreu da mesma forma, porém com adição de *Acartia* sp. durante todo o experimento.

O probiótico comercial utilizado no experimento (AquaStar® Hatchery - Biomin), segundo descrição do produto, continha cepas de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus reuteri* e *Pediococcus acidilactici*, a uma contagem total de células probióticas de 3×10^{12} UFC kg^{-1} . Determinou-se, a partir de experimento preliminar, que a melhor via de administração de probiótico foi através da água do que no alimento vivo. Desta forma, o produto foi administrado na concentração máxima ($0,005 \text{ g L}^{-1}$) conforme recomendado pelo fabricante, ou seja $1,5 \times 10^4$ UFC mL^{-1} , aplicado uma vez ao dia dissolvido diretamente na água dos tanques após a renovação.

Tabela 1: Tratamentos usados no experimento

Código	Dieta
A	Alimentação contínua de <i>Artemia</i> sp. (5 ind mL^{-1})
A-P	Alimentação contínua de <i>Artemia</i> sp. e AquaStar® Hatchery como aditivo de água $0,005 \text{ g L}^{-1}$
CRA	Alimentação mista de rotíferos (5 ind mL^{-1}), <i>Artemia</i> sp. (3 ind mL^{-1}) e <i>Acartia</i> sp. ($1,5 \text{ ind mL}^{-1}$)
CRA-P	Alimentação mista e AquaStar® Hatchery como aditivo de água $0,005 \text{ g L}^{-1}$
RA	Alimentação composta de rotíferos (10 ind mL^{-1}) e <i>Artemia</i> sp. (3 ind mL^{-1})
RA-P	Alimentação de rotíferos e <i>Artemia</i> sp. e AquaStar® Hatchery como aditivo de água $0,005 \text{ g L}^{-1}$

Foram utilizados seis sistemas de recirculação independentes, cada um contendo três aquários de 23 litros com aeração moderada e termostatos, conectados a um sistema de filtragem física (perlon) e biológica (mídia de cerâmica). Para iluminação no interior dos aquários ocorrer da meia água para baixo, foi fixada uma fita LED 3528d de cor branca fria na sua parte frontal.

Os aquários foram povoados com 5 filhotes de cavalos-marinhos por litro, totalizando 2070 recém-nascidos provenientes de três casais de reprodutores, nascidos no mesmo dia, selecionados ao acaso e divididos igualmente para cada aquário (115 por unidade). O fotoperíodo foi ajustado em um ciclo de 14 horas de luz e 10 horas escuro. Durante a realização do experimento, os sistemas de recirculação permaneciam estáticos durante o dia, sendo acionados por 10 horas somente durante o período noturno (22h00 às 8h00). Além disso, pela manhã era feita uma troca parcial de 10 a 20% da água, através de sifonamento diário para remoção de excrementos. A taxa de renovação foi aumentando gradualmente conforme a idade dos animais. Após cada troca de água, todos os tratamentos receberam a microalga *Nannochloropsis oculata*, que foram adicionadas a uma concentração de aproximadamente 20×10^4 células mL^{-1} . Os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados com uso de termomêtro de mercúrio, refratômetro óptico, oxímetro e teste colorimétrico Labcontest®. A temperatura, a salinidade e o pH, mensurados diariamente, foram mantidos em $26,5 \pm 0,3$ °C (média \pm desvio padrão), $22,5 \pm 1,3$ e $7,6 \pm 0,08$, respectivamente. Monitorados a cada três dias, o oxigênio dissolvido, o nitrito e a amônia não ionizada, foram mantidos em $6,2 \pm 0,5$ mg L^{-1} , $\leq 0,50$ mg L^{-1} e $\leq 0,035$ mg L^{-1} , respectivamente.

Avaliação dos índices zootécnicos

No dia do nascimento dos filhotes, a altura, o comprimento total (CT) e o peso, foram estimados a partir da média de 60 indivíduos amostrados ao acaso. A altura foi definida como a soma da altura da coroa, comprimento do tronco e o comprimento da cauda, já o comprimento total foi definido como a soma dos comprimentos da cauda, tronco e cabeça (LOURIE et al., 1999). Estas medidas foram determinadas com auxílio do software “DinoCapture”, acompanhado de uma câmera USB Dino-Eye acoplada a uma lupa estereoscopia binocular e o peso aferido em balança analítica de precisão 0,001g. Os cavalos-marinhos nasceram com altura de $0,70 \pm 0,11$ cm, CT de $0,95 \pm 0,12$ cm e peso de $1,61 \pm 0,39$ mg.

Aos 13 dias após nascimento (DAN), peixes dos tratamentos foram avaliados quanto ao peso corporal, altura e CT. Para isso, foram utilizados os animais sobreviventes dos tratamentos A-P, RA e RA-P ($n = 12$, 83 e 73, respectivamente) e 30 larvas foram retiradas ao acaso dos tratamentos CRA e CRA-P para comparação e avaliação do melhor protocolo

alimentar. Para realização dessa etapa, os animais foram eutanasiados em solução contendo 1 mL de óleo de cravo L⁻¹.

No entanto, com intuito de verificar com maior detalhamento possíveis diferenças estatísticas decorrentes da administração do probiótico comercial, com 16 DAN, os tratamentos que apresentaram maiores índices de sobrevivência (CRA e CRA-P), e consequentemente um n amostral relevante, foram avaliados em relação aos índices zootécnicos, à atividade de enzimas digestivas e à contagens bacterianas das amostras.

Avaliação microbiológica

Ao final do experimento, 10 indivíduos dos tratamentos CRA e CRA-P foram separados para as análises microbiológicas, feitas pelo setor de microbiologia do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC.

Os animais foram lavados com álcool 70% e após com água destilada. Posteriormente, as amostras (animais inteiros) foram pesadas e homogeneizadas em um gral e diluídos serialmente (1/8) em solução salina estéril 3% (SSE) e semeados em meio de cultura Ágar Triptona Soja (TSA), Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e Ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) para contagem de bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp. totais e bactérias ácido-láticas totais, respectivamente. As diluições semeados nas placas de Petri foram incubados em estufa a 30°C e posteriormente efetuadas contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC) após 24 horas de incubação nos meios de cultura Agar TSA e Agar TCBS e 48 horas no meio Agar MRS.

Para contagem microbiológica da água, um pool de amostras das três unidades experimentais provenientes de cada tratamento foi utilizado através de uma alíquota de 1mL para posterior diluição realizando o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Atividade enzimática

Para avaliação das atividades enzimáticas foram utilizadas 50 larvas de *H. reidi* em triplicata, totalizando 150 larvas de cada tratamento (CRA e CRA-P) no término do experimento (16 DAN). Para obtenção do material, os animais foram previamente eutanasiados com óleo de cravo (1 mL L⁻¹) e imediatamente congelados, assim permanecendo até seu processamento.

As amostras foram manualmente homogeneizadas em homogeneizador Potter-Ekvehjem munido de pistilo de teflon. Foi

adicionada água destilada às larvas inteiras, na proporção de 1:10 (m/v), respectivamente, mantendo a solução em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm por 15 min a 4°C. Coletou-se o sobrenadante, o qual foi armazenado a -20°C até a realização das análises enzimáticas. Os valores de pH ótimo para cada atividade enzimática foram previamente determinados em ensaio piloto.

Proteases

As proteinases séricas foram testadas com os substratos bz-R-pNa (N- α -Benzoyl-DL-arginine-4-*p*-nitroanilida) e suc-AAPF-pNa (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida), que possibilitam a verificação da atividade de tripsina e de quimotripsina, respectivamente. Os ensaios foram realizados de acordo com Erlanger et al. (1961) e Del Mar et al. (1979), sendo utilizados 0,05 mL do homogeneizado acrescidos de 0,05 mL do substrato a 2 mM em tampão fosfato/citrato 50 mM em pH 7,5. As reações foram interrompidas em dois intervalos de tempo (60 e 120 min) adicionando-se 1 mL de ácido acético 30%. A leitura de absorbância foi feita em um comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade de atividade (U) de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μ mol de substrato min⁻¹.

Amilase

A análise da atividade da amilase foi realizada através da detecção da presença de grupos redutores na reação com o ácido 3-5, dinitrosalicílico (DNS). O substrato foi preparado contendo 1 mL de solução de amido 5% em tampão acetato de sódio 100mM (ph 6,5) como cofator enzimático, no qual foi adicionado 25 μ L do homogeneizado. As amostras foram incubadas em banho-maria a 30°C e testadas em dois tempos (60 e 120 min), sendo que a interrupção da reação era feita por fervura, colocando os tubos cobertos com papel de alumínio em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após a última interrupção foi adicionado 100 μ L de DNS em cada amostra, as quais foram aquecidas a 100 °C por 5 min. Por fim, às amostras foram acrescidos 100 μ L de água destilada. As leituras foram realizadas em microplaca em uma absorbância a 550 nm no equipamento TECAN (Infinite pro., California, EUA). A atividade da amilase foi calculada em mili unidades (mU), que equivale a 1 μ mol de glicose formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão da glicose.

Análise Estatística

Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada através de Kolmogorov Smirnov e a homocedasticidade através de Cochran. Os dados de altura, comprimento total, peso e sobrevivência das amostras de cavalos-marinho *H. reidi* com 13 DAN foram avaliados pelo Modelo Linear Generalizado através da soma dos quadrados Tipo IV, modelo utilizado para comparar fatores e verificar interação em casos de dados ausentes, uma vez que um dos tratamentos (A) apresentou mortalidade total antes do término do experimento. Os dados de biometria e sobrevivência das amostras de cavalos-marinho *H. reidi* com 16 DAN foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a comparação de médias foi realizado o teste de Tukey. Os dados microbiológicos, transformados em $\log_{10}(x+1)$, e os dados obtidos das atividades enzimáticas foram avaliados pelo teste-T. Todas as análises foram realizadas a partir do programa Statistica Statsoft® versão 13.0 adotando um nível de significância de 5%.

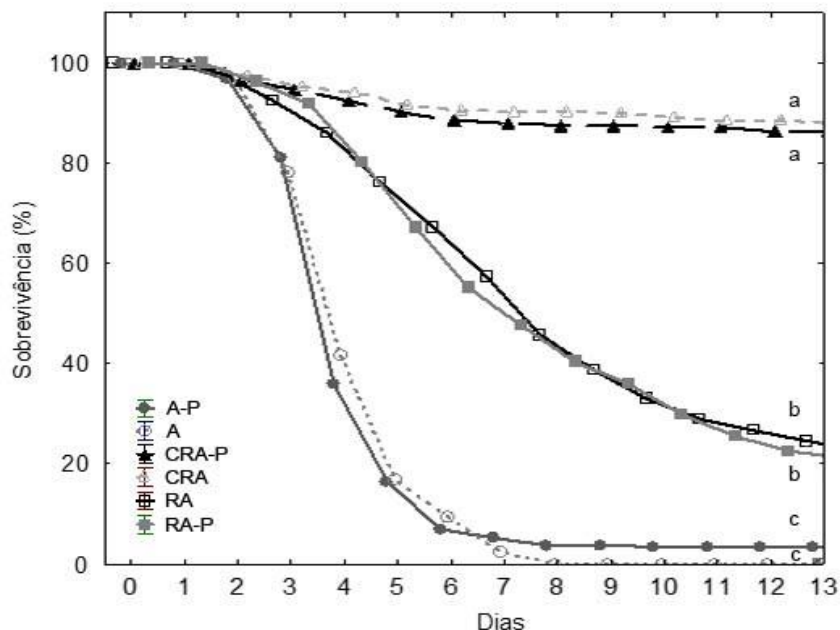
RESULTADOS

As melhores percentagens de sobrevivência para os cavalos-marinhos *H. reidi* foram observadas nos tratamentos que continham os copépodes coletados *Acartia* sp. (CRA e CRA-P), os quais obtiveram 88,12 e 86,38 % de sobrevivência com 13 DAN, respectivamente. Por outro lado, os tratamentos em que foram ofertados somente *Artemia* sp. como item alimentar tiveram os piores resultados. O tratamento A-P teve uma sobrevivência de apenas 3,48%, enquanto no tratamento A, as larvas apresentaram mortalidade total no oitavo DAN. Resultados intermediários foram vistos nos peixes dos tratamentos alimentados com rotíferos e *Artemia* sp. (RA e RA-P), que apresentaram um percentual de sobrevivência de 24,60 e 21,20%, respectivamente (Figura 2).

Aos 13 dias de vida, os melhores resultados de altura e comprimento total (CT) foram observados nos tratamentos CRA e CRA-P (Altura: $1,76 \pm 0,25$ e $1,97 \pm 0,33$ cm; CT: $2,25 \pm 0,29$ e $2,52 \pm 0,40$ cm, respectivamente), demonstrando melhor composição alimentar em relação às outras dietas, porém, quando comparados a mesma dieta com ou sem probiótico, o tratamento CRA-P, com adição de probiótico na água, apresentou melhor desempenho ($p < 0,001$) em relação ao CRA. Os demais tratamentos (A-P, RA e RA-P) não apresentaram diferença significativa em relação ao alimento, mas a adição de probiótico no

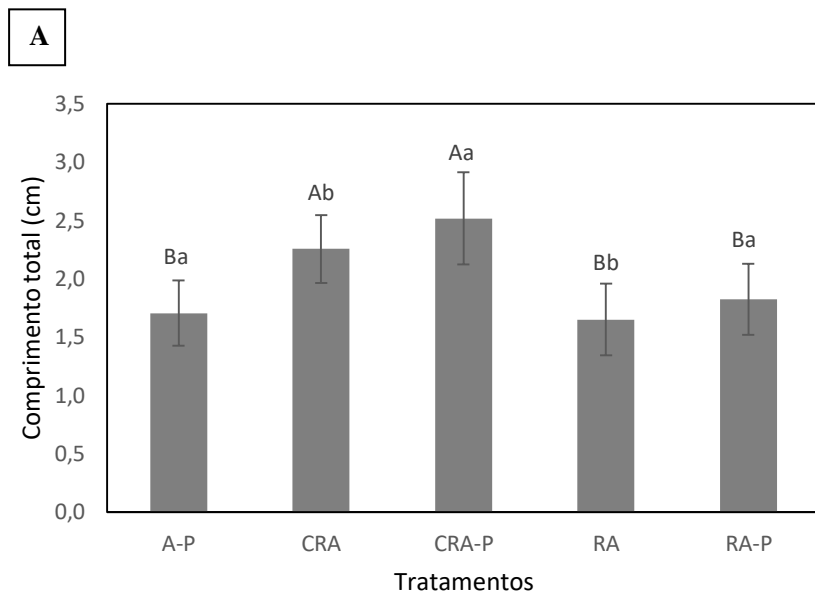
mesmo tratamento alimentar mostrou ser significativa ($p < 0,001$) em relação aos tratamentos em que não foi adicionado (Figura 3).

Figura 2: Percentual de sobrevivência das larvas de *Hippocampus reidi* com 13 DAN submetidos a tratamentos com diferentes dietas, com ou sem probiótico comercial. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Siglas: A- Artêmia; C- Copépodes; R- Rotíferos; P- Probiótico.

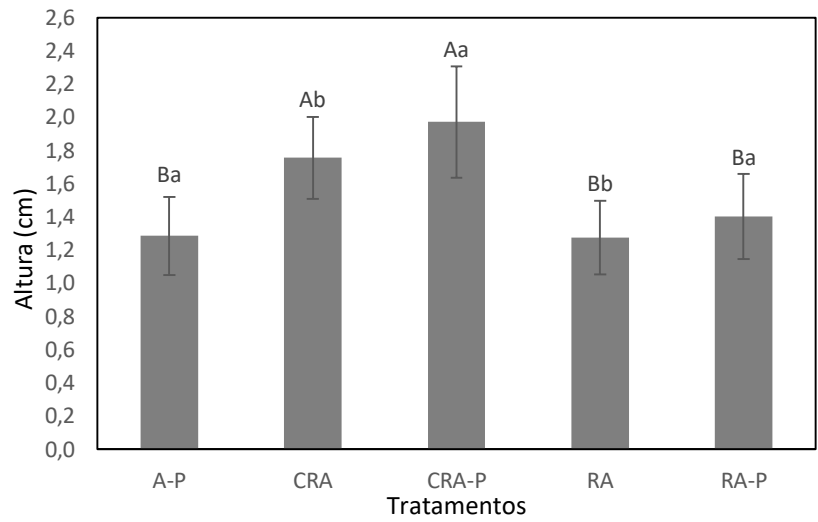


Em relação ao peso das larvas de *H. reidi* com 13 DAN, observa-se diferença significativa apenas em relação ao alimento, nos quais os tratamentos CRA e CRA-P ($31,37 \pm 10,41$ e $38,63 \pm 15,89$ mg, respectivamente) foram superiores ($p < 0,05$) aos demais tratamentos (A-P: $18,08 \pm 8,16$; RA: $7,05 \pm 3,63$ e RA-P: $9,05 \pm 5,09$ mg), sendo que os tratamentos RA e RA-P foram aproximadamente três vezes inferiores aos tratamentos CRA e CRA-P (Figura 3). Não foi possível a realização da biometria para o tratamento A, devido à mortalidade total ocorrida aos 8 DAN.

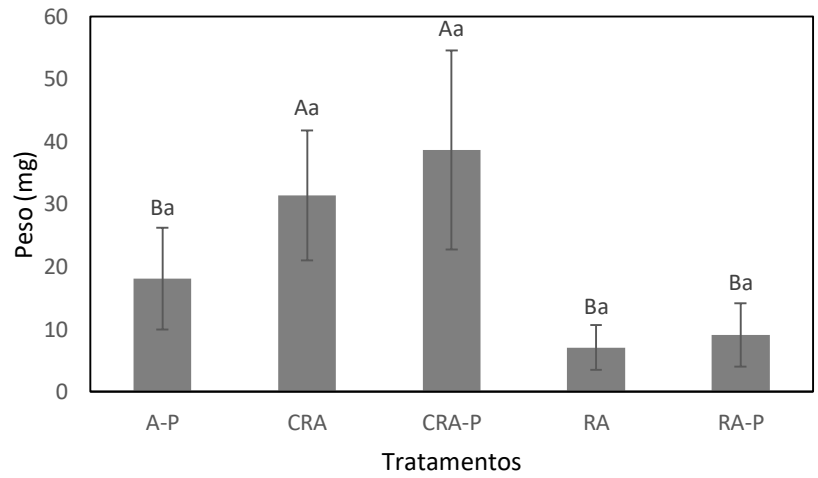
Figura 3: (A) Altura, (B) Comprimento total e (C) Peso das larvas de *Hippocampus reidi* com 13 DAN submetidas à diferentes dietas, contendo ou não probiótico comercial na água dos tanques. Letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre todos os tratamentos (diferentes tipos de alimento) e letras minúsculas indicam diferenças estatísticas nos tratamentos com e sem probiótico ($p < 0,05$). Siglas: A- Artêmia; C- Copépodes; R- Rotíferos; P- Probiótico.



B



C



Ao comparar os índices zootécnicos somente dos tratamentos CRA e CRA-P em animais com 16 DAN, observa-se que os resultados das variáveis mensuradas (altura, comprimento total e peso) foram significativamente maiores ($p < 0,01$) no tratamento em que foi adicionado probiótico na água (CRA-P). Porém, mesmo não apresentando diferença estatística, os dois tratamentos obtiveram bons índices de sobrevivência (Tabela 2).

Tabela 2: Média (\pm DP) da sobrevivência (%), da altura (cm), do comprimento total (cm) e do peso (mg) das larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* com 16 DAN cultivadas com copépodes, rotíferos e artêmia sem probiótico (CRA) e com adição de probiótico comercial na água (CRA-P). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Tratamentos	Sobrevivência	Altura	Comprimento total	Peso
CRA	87,54 ^a \pm 6,64	2,59 ^b \pm 0,26	3,27 ^b \pm 0,33	71,16 ^b \pm 26,21
CRA-P	86,09 ^a \pm 3,14	2,74 ^a \pm 0,23	3,45 ^a \pm 0,28	80,37 ^a \pm 21,57

O efeito do AquaStar® Hatchery sobre as bactérias heterotróficas totais, *Vibrios* sp. e as bactérias ácido-láticas (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus reuteri* e *Pediococcus acidilactici*, componentes no probiótico), apresentam-se na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das contagens de bactérias entre os tratamentos, apesar de serem encontrados níveis mais elevados de bactérias ácido-láticas nas amostras dos animais e da água do tratamento com adição de probiótico (CRA-P), além de menores níveis de *Vibrios* sp..

Apesar das atividades enzimáticas específicas dos tratamentos CRA e CRA-P com 16 DAN (tripsina, quimotripsina e amilase) terem sido numericamente maiores no tratamento administrado com probiótico (CRA-P), estatisticamente os dados não apresentaram diferença (Tabela 4).

Tabela 3: Contagens bacterianas de amostras do *Hippocampus reidi* (16 DAN) dos tratamentos em que foram alimentados com copépodes, rotíferos e artêmia sem probiótico (CRA) e com adição de probiótico comercial (CRA-P) na água, além de amostras da água (pool) dos tratamentos, respectivamente.

Tratamentos	Contagem bacteriana Log UFC g ⁻¹ (CRA e CRA-P) e mL ⁻¹ (Água)		
	Bactérias totais	Vibrios	Ácido-lácticas
CRA	7,40 ± 2,01	6,72 ± 2,17	3,98 ± 1,45
CRA-P	6,18 ± 0,77	4,26 ± 0,38	4,87 ± 0,35
Água controle	7,95	3,7	3,34
Água probiótico	5,7	0	6

Tabela 4: Atividade específica de proteases (tripsina e quimotripsina) e amilase do *Hippocampus reidi* (16 DAN) alimentados com copépodes, rotíferos e artêmia (CRA) e acrescidos de probiótico comercial (CRA-P).

Tratamentos	Atividade enzimática mU mg ⁻¹ de proteína		
	Tripsina	Quimotripsina	Amilase
CRA	15,50 ± 0,97	15,54 ± 0,95	6,30 ± 0,77
CRA-P	19,52 ± 2,05	19,53 ± 2,05	7,46 ± 2,20

DISCUSSÃO

A alimentação é considerada um dos fatores mais decisivos na sobrevivência da larvicultura de cavalos-marinhos (OLIVOTTO et al., 2008; PHAM e LIN, 2013) e está intimamente relacionada com a disponibilidade de presas e a qualidade dos alimentos após o esgotamento do saco vitelínico (YÚFERA e DARIAS, 2007). No presente estudo, os valores dos parâmetros de comprimentos, peso e sobrevivência foram significativamente maiores nas larvas de cavalos-marinhos alimentadas com as dietas que continham o copépode *Acartia* sp. (CRA e CRA-P), do que nas que foram alimentadas somente com artêmia (A e A-P) ou rotíferos e artêmia (RA e RA-P). Verificou-se ainda que, com a utilização das dietas RA e CRA, os cavalos-marinhos atingiram aos 13 DAN em média 1,65 e 2,25 cm de comprimento total, respectivamente. O mesmo

padrão ocorreu quando fornecidas estas dietas enriquecidas com probiótico (RA-P:1,82 cm e CRA-P:2,52 cm). Resultados semelhantes foram obtidos no primeiro estudo publicado sobre a criação de *H. reidi*, onde os filhotes atingiram 1,75 cm aos 14 DAN com uso de dieta composta de rotíferos e artêmia, e 2,25 cm quando o copépode harpacticóide *Tisbe* sp. foi incluído na dieta (OLIVOTTO et al., 2008).

Estas diferenças de crescimento provavelmente estão associadas à composição de ácidos graxos das presas. Barroso et al. (2013) analisaram o perfil de ácidos graxos de copépodes selvagens (> 90% *Acartia tonsa*), cultivados (*Acartia tonsa*) e de rotíferos (*B. rotundiformis*), verificando que as quantidades de PUFA foram superiores em copépodes selvagens (360 mg g⁻¹), do que em rotíferos e copépodes cultivados (161 e 67 mg g⁻¹, respectivamente). Adicionalmente, grandes quantidades de ácido docosa-hexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) (170 e 96 mg g⁻¹, respectivamente) foram encontrados em copépodes selvagens, muito superiores ao observado em rotíferos (3,4 e 62,5 mg g⁻¹, respectivamente) e copépodes cultivados (14,5 e 8,5 mg g⁻¹, respectivamente). McEvoy et al. (1998) citam ainda que, o nível de DHA em copépodes selvagens pode ser dez vezes maior do que o nível encontrado em artêmia, mesmo quando enriquecida. Portanto, o desempenho insatisfatório das dietas sem inclusão do copépode coletado *Acartia* sp. (A e RA), mesmo com adição do probiótico (A-P e RA-P), pode ser o resultado de uma menor concentração desses ácidos graxos presente nesses alimentos em relação aos copépodes coletados.

Durante a criação de cavalos-marinhos, elevadas taxas de mortalidade podem ocorrer principalmente durante a fase pelágica (5-7 dias), diminuindo após a mudança para fase bentônica (HORA e JOYEUX 2009). Neste estudo, o uso exclusivo de *Artemia* sp. como alimento (A e A-P) resultou em uma expressiva mortalidade a partir do 3º DAN. A alta taxa de mortalidade neonatal parece ser devido à incompleta maturação do sistema digestivo antes da metamorfose, sugerindo a incapacidade de recém-nascidos para digerir o mesmo tipo de alimento do que juvenis ou adultos (YU'FERA e DARIAS, 2007). Novelli (2015) verificou que os recém-nascidos de *H. reidi* alimentados com náuplios de *Artemia* sp. foram capazes de assimilar os lipídios provenientes da alimentação exógena apenas no 3º/4º DAN, portanto, recomenda-se a inclusão de *Artemia* sp. na dieta a partir desse momento. Já, Olivotto et al. (2011) verificaram que filhotes de *H. guttulatus* foram capazes de digerir *Artemia* sp. eficientemente somente a partir do 10º DAN.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a importância de copépodes calanóides como alimento complementar nas dietas tradicionais a base de rotíferos e artêmia na larvicultura de *H. reidi*. No entanto, a principal limitação está relacionada com a sua produção em larga escala. Copépodes calanóides são difíceis de serem cultivados em uma base contínua, podendo ser cultivados apenas em densidades muito baixas e alimentados com combinações de algas (HOLT, 2003). No presente estudo, foram usados apenas copépodes coletados, assim como utilizados em cultivo comercial no Brasil, onde a primeira alimentação é constituída somente de zooplâncton selvagem (HORA et al., 2010). Apesar das vantagens, como baixo custo, tamanho variado, alto valor nutritivo e altas taxas de ácidos graxos, a coleta destes organismos em ambiente natural pode apresentar desvantagens, como a instabilidade nos locais de coleta em relação a contaminações e abundância, a diversidade e qualidade de organismos influenciadas pela sazonalidade e pelo clima, assim como a possibilidade de organismos patogênicos e/ou oportunistas serem introduzidos ao sistema de cultivo (HORA, 2015).

Enquanto foram registrados pontos importantes da alimentação no cultivo de cavalos-marinhos, outros obstáculos ainda precisam ser superados para sua produção em larga escala. Como estes animais são especialmente vulneráveis à doenças durante suas primeiras semanas de vida (WILSON e VINCENT, 1998), qualquer alteração nos fatores ambientais pode atuar diretamente na sobrevivência destes animais em cativeiro. Por exemplo, em um dos estudos realizados no laboratório com *H. reidi* alimentados com copépodes coletados, após 40 dias, com 80% dos sobreviventes restantes (500 indivíduos), todos os juvenis morreram entre o 40º e 45º dia de cultivo, no qual através de testes parciais a causa foi atribuída a uma bacteriose (SOUZA, 2016, comunicação pessoal). Balcázar et al. (2009), ao analisarem superfícies mucosas de duas espécies de cavalo-marinhos doentes (*H. guttulatus* e *H. hippocampus*), identificaram predominantemente as espécies *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio splendidus*, sugerindo estarem associadas aos sinais clínicos de doenças dos cavalos-marinhos criados em cativeiro.

Vários autores relatam que o uso de probiótico como suplemento alimentar ou adicionado na água, reduzem as cargas de *Vibrio* sp. dos cultivos (AVELLA et al., 2010; 2011; TALPUR et al., 2013) e/ou conferem maior resistência frente a esses patógenos (CASTEX et al., 2010; ZHAO et al., 2012). No presente estudo, ao analisar os dois tratamentos que tiveram maiores taxas de sobrevivências (CRA e CRA-P), nota-se que, ainda que sem diferenças significativas, numericamente menores níveis de *Vibrios* sp. foram encontrados nos animais e na água

do CRA-P, do mesmo modo que mais bactérias ácido-láticas foram quantificadas neste tratamento com probiótico. Taipur et al. (2013) utilizando diferentes concentrações do probiótico *Lactobacillus plantarum* como aditivo de água da larvicultura de *Portunus pelagicus*, relataram menores contagens de *Vibrio* sp. em relação ao controle, sugerindo que o probiótico melhorou a qualidade da água em termos de modulação positiva da microbiota, o que pode ter contribuído para efeitos benéficos na larvicultura. Já Standen et al. (2016), ao avaliarem o efeito de um probiótico (AquaStar® Growout) que continha as mesmas cepas do utilizado neste estudo em tilápias *Oreochromis niloticus* durante seis semanas, não observaram diferença estatística na contagem de bactérias viáveis autóctones, porém em um dos tratamentos em que foi adicionado 3 g de probiótico por kg de ração, maiores níveis de bactérias ácido-láticas e enterococos foram observados em relação ao controle. Esta diferença pode ser atribuída ao maior tempo de exposição dos animais ao probiótico, bem como a dosagem e modo de aplicação, que foi de 0,005 g L⁻¹ no presente estudo, em comparação com 3 g kg⁻¹ usado pelos autores. Ainda que a dosagem aqui utilizada tenha sido a quantidade máxima recomendada pelo fabricante, a concentração pode ter sido baixa a ponto de reduzir as cargas de *Vibrio* sp. e aumentar significativamente os níveis de bactérias ácido-láticas na água e nas larvas de *H. reidi*.

Embora não hajam dados sobre efeito do probiótico comercial aqui utilizado (AquaStar® Hatchery) sobre o crescimento de cavalos-marinhos, o fornecimento de *Lactobacillus* sp. (AVELLA et al., 2009), *Pediococcus* sp. (NEISSI et al., 2013), *Bacillus* sp. (BHATNAGAR e LAMBA, 2015) e *Enterococcus* sp. (GIANNENAS et al., 2015) quer isoladamente ou em combinação com outras espécies de bactérias, mostraram melhorar os indicadores de desempenho de crescimento em peixes ornamentais (*Amphiprion ocellaris* e *Aequidens rivulatu*) ou de corte (*Cirrhinus mrigala* e *Oncorhynchus mykiss*), respectivamente. Nesse estudo o tratamento CRA-P apresentou maior crescimento em relação à todos comprimentos mensurados e ao peso corporal com 16 DAN, representando um leve aumento de 5,8% no comprimento total e 12,9% no peso quando comparado com o controle (CRA). O efeito do probiótico sobre o crescimento pode manifestar-se indiretamente através de vários mecanismos, incluindo um aumento na disponibilidade de nutrientes e produção de enzimas digestivas suplementares (DOESCHATE e COYNE, 2008) ou por estimulação da produção de enzimas endógenas pelo hospedeiro (LAZADO et al., 2012). Assim, tem-se uma maior digestibilidade e maior capacidade de

absorção dos nutrientes, proporcionando uma tendência de aumento dos índices de crescimento (DOESCHATE e COYNE, 2008).

Ao avaliar a atividade enzimática específica, observa-se que em animais com 16 DAN no tratamento CRA-P houve um aumento em todas as enzimas ensaiadas (tripsina, quimotripsina e amilase). No entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo, podendo estar relacionado ao baixo n amostral ($n = 3$). Assim, apesar do tratamento CRA-P ter apresentado melhor desempenho de crescimento, não se pode afirmar que foram decorrentes de um efeito do probiótico no aumento da atividade enzimática específica. Do contrário, Wang (2007) suplementou a dieta para o camarão *Litopenaeus vannamei* com bactérias fotossintéticas e *Bacillus* sp. e relatou um aumento das atividades de protease, amilase, lipase e celulase e melhor desempenho de crescimento em relação ao controle. A administração do probiótico *Lactobacillus* sp. melhorou a atividade de enzimas digestivas e o crescimento do pargo *Sparus aurata* (SUZER et al., 2008). Da mesma forma, o desempenho de crescimento e atividade de algumas enzimas digestivas foram melhorados através da adição de *Rhodotorula benthica* na dieta do pepino do mar *Apostichopus japonicus* (WANG et al., 2015).

O uso de probióticos na água de cultivo, pode ser considerado uma eficaz via de administração. É possível que os alimentos vivos ofertados às larvas possam ter ingerido o probiótico da água de cultivo ou o mesmo pode ter sido diretamente ingerido pelas larvas, aumentando suas funções digestivas e surtindo efeitos benéficos no crescimento. Villamil et al. (2010), determinaram a água como melhor meio para a introdução de *Pediococcus acidilactici* no cultivo do pregado *Psetta maxima*, do que quando administrado por meio de rotíferos. Porém, outros autores relatam um melhor efeito através do alimento vivo (SUZER et al., 2008) e no alimento vivo e na água de forma concomitante (AVILLA et al., 2009; NIMRAT et al., 2011). Desta forma, mais pesquisas são necessárias afim de determinar outras vias de administração, obter concentrações adequadas do probiótico e também buscar estratégias para isolar bactérias probióticas a partir do intestino de adultos de *H. reidi* para posteriormente utilizá-las nas larvas da mesma espécie.

CONCLUSÕES

A dieta com adição dos copépodes *Acartia* sp., foi considerada claramente a mais eficaz, pois através dela obteve-se significativamente melhores índices de crescimento e maior sobrevivência dos filhotes de

cavalo-marinho, demonstrando a importância deste alimento vivo como complemento alimentar para dietas a base de rotíferos e artêmia.

A utilização do probiótico comercial AquaStar® Hatchery como aditivo de água na larvicultura de *H. reidi*, mostrou ser benéfica para o crescimento das larvas após 16 dias de experimento, a qual considera-se resultados promissores, tendo em vista que este é o primeiro estudo envolvendo o uso de probiótico na larvicultura de cavalos-marinhos, porém mais estudos devem ser conduzidos neste sentido.

Este estudo contribui para o avanço no pacote tecnológico da produção do cavalo-marinho *H. reidi* em cativeiro, nos quais os resultados apresentam importantes implicações nos potenciais de iniciativas comerciais e de conservação para a espécie.

REFERÊNCIAS

- ALCAIDE, E.; GIL-SAZ, C.; SANJUÁN, E.; ESTEVE, D.; AMARO, C.; SILVEIRA, L. 2001 *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp. *Journal Fish Diseases*, 24: 311-313.
- AL-DOHAIL, M.A.; HASHIM, R.; ALIYU-PAIKO, M. 2009 Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*, 40: 1642-1652.
- ARCARUIBAL, B. e SAINSBURY, A.W. 2005 Disease of Syngnathidae and their treatment and control. *British Veterinary Zoological Society*, 5: 31-34.
- AUSTIN, B. e AUSTIN, D. 2007 *Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish*. 4ªed. Chichester: Springer. 594p.
- AVELLA, M.A.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; PLACE, A.R.; CARNEVALI, O. 2009 Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298: 359-371.
- AVELLA, M.A.; GIOACCHINI, G.; DECAMP, O.; MAKRIDIS, P.; BRACCIAPELLI, C.; CARNEVALI, O. 2010 Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 305: 12-19.

AVELLA, M.A.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; RIBECCO, C.; CRESCI, A.; PALERMO, F.; POLZONETTI, A.; CARNEVALI, O. 2011 Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture*, 315: 384-393.

BALCÁZAR, J.L.; DE BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I.; CUNNINGHAM, D.; VENDRELL, D.; MUZQUIZ, J.L. 2006 The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186.

BALCÁZAR, J.L.; GALLO-BUENO, A.; PLANAS, M.; PINTADO, J. 2009 Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 97: 207-210.

BARROSO, M. V.; DE CARVALHO, C.V.A.; ANTONIASSI, R.; CERQUEIRA, V.R. 2013 Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture*, 388-391: 153– 158.

BAUM, J.K. e VINCENT, A.C.J. 2005 Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America. *Environmental Conservation*, 32: 305-320.

BHATNAGAR, A. e LAMBA, R. 2015 Antimicrobial ability and growth promoting effects of feed supplemented with probiotic bacterium isolated from gut microflora of *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Integrative Agriculture*, 14: 583-592.

BULL, C. 2002 *Seahorse husbandry in public aquaria: Manual, with chapters contributed by members of the Syngnathid Discussion Group*. Chicago: Shedd Aquarium, 56p.

CARLOS, M.T.L.; RIBEIRO, F.A.S.; WAINBERG, A.A. 2009 Produção de cavalo-marinho em tanque-rede. *Panorama da Aquacultura*, 113: 32– 37.

CASTEX, M.; LEMAIRE, P.; WABETE, N.; CHIM, L. 2010 Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 622-631.

CASTRO, A.L.C.; DINIZ, A.F.; MARTINS, I.Z.; VENDEL, A.L.; OLIVEIRA, T.P.R.; ROSA, I.M.L. 2008 Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) as a study-case. *Neotropical Ichthyology*, 6: 637-644.

CELINO, F.T.; HILOMEN-GARCIA, G. V.; DEL NORTE-CAMPOS, A.G.C. 2012 Feeding selectivity of the seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker), juveniles under laboratory conditions. *Aquaculture Research*, 43: 1804-1815.

CHABRILLON, M.; RICO, R.M.; BALEBONA, M.C.; MORINIGO, M. 2005 Adhesion to sole *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida. *Journal Fish Diseases*, 28: 229-237.

CITES, 2010 *Conservation on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna*. Disponível em: <www.cites.org2010> Acesso em 20 de março de 2016.

DEL MAR, E.G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J.W.; GEOKAS, M.C. 1979 A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, 99: 316-320.

DOESCHATE, K.T e COYNE, V. 2008 Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment *Aquaculture*, 284: 174-179.

ERLANGER, B.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. 1961 The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278.

FORTEATH, N. 1996 Seahorses, *Hippocampus abdominalis* in culture. *Austasia Aquaculture*, 9: 83-84.

FOSTER, S.J. e VINCENT, A.C.J. 2004 Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal Fish Biology*, 65: 1-61.

GIANNENAS, I.; KARAMALIGAS, I.; MARGARONI, M.; PAPPAS, I.; MAYER, E.; ENCARNAÇÃO, P.; KARAGOUNI, E. 2015 Effect of

dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Physiology and Biochemistry*, 41: 119-128.

HOFF, F. e SNELL, T. 2008 *Plankton culture manual*. 6ª ed. Florida: Florida Aqua Farms. 183p.

HOLT, G.J. 2003 Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: CATO, J.C. e BROWN, C.L. *Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation*. Iowa State Press, Ames, IO, p. 251-254.

HORA, M.S.C. e JOYEUX, J.C. 2009 Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture*, 292: 37-41.

HORA, M.S.C.; JOYEUX, J.C.; CARLOS, E.M.T.L. 2010 Cultivo de Cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*). In: B. BALDISSEROTTO e L. C. GOMES. *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*, 2ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, p. 401-428.

HORA, M.S.C. 2015 *Determinação de condições bióticas e abióticas ideais durante o estágio inicial de desenvolvimento de juvenis de cavalo-marinho *Hippocampus reidi* cultivados*. Florianópolis. 82 f. (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC).

IRIANTO, A. e AUSTIN, B. 2002 Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal Fish Diseases*, 25: 333-342.

KHATTAB, Y.A.E.; SHALABY, A.M.E.; SHARAF, S.M.; EL-MARAKBY, H.; RIZLALLA, E.H. 2004 The physiological changes and growth performance of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after feeding with Biogen as growth promoter. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 8: 145-158.

KOLDEWEY, H.J. e MARTIN-SMITH, K.M. 2010 A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*, 302: 131-152.

KOLDEWEY, H. 2005 *Seahorse husbandry in public aquariums: Manual, with chapters contributed by members of the Syngnathid Discussion Group*, London, 137p.

LAZADO, C.C.; CAIPANG, C.M.A.; KIRON, V. 2012 Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. *Aquaculture Nutrition*, 18: 423-431.

LIN, Q.; GAO, Y.; SHENG, J.; CHEN, Q.; ZHANG, B.; LU, J. 2007 The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture*, 262: 481-492.

MARTINS, M.L.A.; MOURIÑO, J.L.P.; FEZER, G.F.; BUGLIONE NETO, C.C.; GARCIA, P.; SILVA, B.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N. 2010 Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 70: 205-209.

McEVOY, L.A.; NAEISS, T.; BELL, J.G.; LIE, O, 1998 Lipid and fatty acid composition of normal and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*, 180: 321-343.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração. 2004 INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 05, de 21 de Maio de 2004. *Diário Oficial da União*, Brasília, nº.102, p.136-142.

MORELLI, L.; ZONENSCHAIN, D.; CALLEGARI, M.L.; GROSSI, E.; MAISANO, F.; FUSILLO, M. 2003 Assessment of a new synbiotic preparation in healthy volunteers: survival, persistence of probiotic strains and its effect on the indigenous flora. *Nutrition Journal*, 2: 11-16.

NEISSI, A.; RAFIEE, G.; NEMATOLLAHI, M.; SAFARI, O. 2013 The effect of *Pediococcus acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35: 1976-1980.

NIMRAT, S.; BOONTHAI, T.; VUTHIPHANDCHAI, V. 2011 Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration

on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. *Animal Feed Science and Technology*, 169: 244-258.

NOVELLI, B.; OTERO-FERRER, F.; DIAZ, M.; SOCORRO, J.A.; CABALLERO, M.J.; MOLINA DOMÍNGUEZ L.; MOYANO, F.J. 2016 Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). *Aquaculture*, 464: 196-204.

NOVELLI, B.; SOCORRO, J.A.; CABALLERO, M.J.; OTERO-FERRER, F.; SEGADÉ-BOTELLA, A.; DOMÍNGUEZ, L.M. 2015 Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. *Fish Physiology. Biochemistry*, 41: 1233-1251.

OBIS, (sem data, on line) *Ocean Biogeographic Information System*. Disponível em: <<http://www.iobis.org/explore/#/taxon/633508>> Acesso em: 15 Maio de 2016.

OLIVOTTO, I.; AVELLA, M. A.; SAMPAOLES, G.; PICCINETTI, C.C.; NAVARRO RUIZ, P.; CARNEVALI, O. 2008 Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture*, 283: 92-96.

OLIVOTTO, I.; PLANAS, M.; SIMÕES, N.; HOLT, G.J.; AVELLA, M.A.; CALADO, R. 2011 Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of the world aquaculture society*. 42: 135-166.

PAYNE, M. e RIPPINGALE, R. 2000 Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture*, 188: 353-361.

PHAM, N.K. e LIN, J. 2013 The Effects of different feed enrichments on survivorship and growth of early juvenile longsnout seahorse, *Hippocampus reidi*. *Journal World Aquaculture Society*, 44: 435-446.

ROSA, I.M.L.; ALVES, R.R.N.; BONIFÁCIO, K.M.; MOURÃO, J.S.; OSÓRIO, F.M.; OLIVEIRA, T.P.R.; NOTTINGHAM, M.C. 2005 Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. *Journal Ethnobiology Ethnomedicine*, 1: 1-15.

SOUZA-SANTOS, L.P.; REGIS, C.G.; MELO, R.C.S.; CAVALLI, R.O. 2013 Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. *Aquaculture*, 404-405: 35-40.

STANDEN, B.T.; PEGGS, D.L.; RAWLING, M.D.; FOYE, A.; DAVIES, S.J.; SANTOS, G.A.; MERRIFIELD, D.L. 2016 Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49: 427-435.

SUZER, C.; COBAN, D.; KAMACI, H.O.; SAKA, S.; FIRAT, K.; OTGUCUOĞLU, O.; KÜÇÜKSARI, H. 2008 *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280: 140-145.

TALPUR, A.D.; IKHWANUDDIN, M.; ABDULLAH, M.D.D.; BOLONG, A.A. 2013 Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. *Aquaculture*, 416-417: 173-178.

VAN WASSENBERGH, S.; ROOS, G.; GENBRUGGE, A.; LEYSEN, H.; AERTS, P.; ADRIAENS, D.; HERREL, A. 2009 Suction is kid's play: extremely fast suction in newborn seahorses. *Biology Letters*, 5: 200-203.

VINCENT, A.C.J.; FOSTER, S.J.; KOLDEWEY, H.J. 2011 Conservation and management of seahorses and other Syngnathidae. *Journal of Fish Biology*, 78:1681-1724.

VILLAMIL, L.; FIGUERAS, A.; PLANAS, M.; NOVOA, B. 2010 *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: Administration pathways. *Aquaculture*, 307: 83-88.

VINE, N.G.; LEUKES, W.D.; KAISER, H.; DAYA, S.; BAXTER, J.; HECHT, T. 2004 Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal Fish Diseases*, 27: 319-326.

WANG, Y. 2007 Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269: 259-264.

WANG, J.; ZHAO, L.; LIU, J.; WANG, H.; XIAO, S. 2015 Effect of potential probiotic *Rhodotorula benthica* D30 on the growth performance, digestive enzyme activity and immunity in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 43: 330-336.

WITTENRICH, M.L. 2007 *The Complete Illustrated Breeder's Guide to Marine Aquarium Fishes*. Charlote: Tfh Publications. 304p.

WILLADINO, L.; SOUZA-SANTOS, L.P.; MÉLO, R.C.S.; BRITO, A.P.; BARROS, N.C.S.; ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; GALVÃO, D.B.; GOUVEIA, A.; REGIS, C.G.; CAVALLI, R.O. 2012 Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture*, 360-361: 10-16.

WILSON, M.J. e VINCENT, A.C.J. 1998 Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity. *Aquarium Sciences and Conservation*, 2: 179-196.

YÚFERA, M. e DARIAS, M.J. 2007 The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53-63.

ZHAO, Y.; ZHANG, W.; XU, W.; MAI, K.; ZHANG, Y.; LIUFU, Z. 2012 Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32: 750-755.

3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALCAIDE, E. et al. *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus* sp.. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, p. 311-313, 2001.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. **Chichester: Springer**, v. 4, p. 594, 2007.

BALCÁZAR, J. L. et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from captive-bred seahorses with disease symptoms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 2, p. 207-210, 2009.

BARROSO, M. V. et al. Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. **Aquaculture**, v. 388-391, p. 153-158, 2013.

BAUM, J. K.; VINCENT A. C. J. Magnitude and inferred impacts of the seahorse trade in Latin America. **Environmental Conservation**, v. 32, n. 4, p. 305-319, 2005.

BERGERT, A.; WAINWRIGHT, P. C. Morphology and kinematics of prey capture in the syngnathid fishes *Hippocampus erectus* and *Syngnathus floridae*. **Marine Biology**, v. 127, p. 563-570, 1997.

BEZERRA, A. J. M. *Utilização de probiótico em sistema de policultivo de tilápias com camarões marinhos*. Dissertação de Mestrado, Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 43p., 2008.

BULL, C. Seahorse husbandry in public aquaria: Manual, with chapters contributed by members of the Syngnathid Discussion Group. **Project Seahorse**, 56p., 2002.

BURHANS, R. A.; MELECHINSKY. D. Seahorse husbandry and propagation. **Scripps Institution of Oceanography**, p. 1-8, 2000.

CASTRO, A. L. D. C. et al. Assessing diet composition of seahorses in the wild using a non destructive method: *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae) as a study-case. **Neotrop Ichthyol**, v. 6, p. 637-644, 2008.

CELINO, F.T.; HILOMEN-GARCIA, G. V.; del NORTE-CAMPOS, A.G.C. Feeding selectivity of the seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker),

juveniles under laboratory conditions. **Aquaculture Research**. v. 43, p. 1804-1815, 2012.

CITES - Conservation on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, 2010. Disponível em: www.cites.org/2010. Acesso em 20 de março de 2016.

CORRÊA, A. S. et al. Ocorrência de *Hippocampus reidi* Ginsburg 1933 (Teleostei: Syngnathidae) em ambientes naturais no estado de Santa Catarina, Brasil. **XIV Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar**, 2011.

ESSA, M. et al. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the Arabian Aquaculture Society**. v. 5, p. 143-161, 2010.

FELÍCIO, A.K.C. et al. Feeding behavior of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. **Journal of Ethology**, v. 24, n. 3, p. 219-225, 2006.

FERREIRA, A. H. C. et al. Uso de probióticos na aquicultura - Revisão. **Nutritime**, v. 9, n. 5, p. 1965-1980, 2012.

FORTEATH, N. Seahorses, *Hippocampus abdominalis* in culture. **Austasia Aquaculture**, v. 9, n. 6, p. 83-84, 1996

FOSTER, S. J.; VINCENT, A.C.J. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 1-61, 2004.

FULLER, R. Probiotics in man and animal. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 5, p. 518-526, 2007.

HOFF, F.; SNELL, T. Plankton culture manual. 6 ed. Florida: **Florida Aqua Farms**, 183p., 2008.

HOLT, G. J. Research on culturing the early life history stages of marine ornamental species. In: Cato, J.C., Brown, C.L. (Eds.), Iowa State: **Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation**, p. 251-254, 2003.

HORA, M.S.C.; JOYEUX, J.C. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 292, p. 37-41, 2009.

HORA, M. S. C.; JOYEUX J. C.; CARLOS, E M. T. L. Cultivo de cavalo-marinho (*Hippocampus reidi*). 2 ed, Santa Maria: **Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil**, UFSM, p. 401-428, 2010.

HORA, M.S.C. *Determinação de condições bióticas e abióticas ideais durante o estágio inicial de desenvolvimento de juvenis de cavalo-marinho Hippocampus reidi cultivados*. Tese de Doutorado, Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 82p., 2015.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Instrução normativa nº.56, de 23 de novembro de 2004. Diário Oficial da União, Seção 1. n. 225, p. 50-51, 2004.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2014. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/destaques-e-eventos/474-realizada-oficina-de-consolidacao-do-pancorais>. html. Acesso em 18 de abril de 2016.

JENNINGS, S.; KAISER, M.J.; REYNOLDS, J.D. Marine Fisheries Ecology. London: **Blackwell Sciences**, 2001.

JOB, S.; ARVEDLUND, M.; MARNANE, M. Captive breeding of coral reef fishes. **Australia Aquaculture**, v. 11, n. 3, p. 56-59, 1997.

JOB, S. D.; BUU, D.; VINCENT, A. Growth and survival of the tiger seahorse *Hippocampus comes*. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 37, p. 322-327, 2006.

KENDRICK, A. J.; HYNDES, G. A. Variations in the dietary compositions of morphologically diverse syngnathid fishes. **Environmental Biology Fishes**, v.72, p. 415-427, 2005.

KOLDEWEY, H. J.; MARTIN-SMITH, K. M. A global review of seahorse aquaculture. **Aquaculture**, v. 302, p. 131-152, 2010.

KOLDEWEY, H. Seahorse husbandry in public aquariums: Manual, with chapters contributed by members of the Syngnathid discussion group. London: **Zoological Society of London**, 137p., 2005.

LENOIR, D. S. et al. Effects of first feeding on survival, growth and lipid composition of short-snouted seahorse juveniles, *Hippocampus hippocampus*, (Linnaeus). **Book of Abstracts XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding**, p. 315, 2008.

LIN, Q. et al. The effects of food and the sum of effective temperature on the embryonic development of the seahorse, *Hippocampus kuda*. **Aquaculture**, v. 262, p. 481-492, 2007.

LOURIE, S. A.; VINCENT, A. C. J.; HALL, H. J. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. London: **Project Seahorse**. 214 p., 1999.

LOURIE, S. A. et al. A guide to the identification of seahorses. Washington: **Project Seahorse and traffic North America**. University of British Columbia and World Wildlife Fund, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M; PARKER, J. Brock biology of microorganism. **Upper Saddle River**, 991p., 2002.

MARTINEZ-CARDENAS, L.; PURSER, G. J. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). **Aquaculture**, v. 264 p. 92-100. 2007.

MARTINS, M. L. A. et al. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the seahorse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. **Brazilian Jornal of Biology**, v. 70, p. 205-209, 2010.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. Instrução Normativa

nº 05, de 21 de Maio de 2004.
Diário Oficial da União. n.102, p.136-142, 2004.

MORELLI, L. et al. Assessment of a new synbiotic preparation in healthy volunteers: survival, persistence of probiotic strains and its effect on the indigenous flora. **Nutrition Journal**, v. 2, p. 11-16, 2003.

MUNILLA-MORAN, R.; STARK, J.R.; BARBOUR, A. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 88, p. 337-350, 1990.

NELSON, J. S. Fishes of the World. Edmonton. **John Wiley & Sons**, 595p., 2006.

OBIS - Ocean Biogeographic Information System. Disponível em: <http://www.iobis.org/explore/#/taxon/633508>. Acesso em: 15 Maio de 2016.

OCHOA-SOLANO, J.L; OLMOS-SOTO, L. The functional property os *Bacillus* for shrimp feeds. **Food Microbiology**, v. 23, p. 519-525, 2006.

OCKEN, A. E. J. *Prey capture techniques of the seahorse Hippocampus abdominalis feeding on swarming prey*. Honours thesis, University of Tasmania, 1994.

OLIVOTTO, I. et al. Spawning, early development and first feeding in the Lemonpeel angelfish *Centropyge flavissimus*. **Aquaculture**, v. 253, p. 270-278, 2006.

OLIVOTTO, I. et al. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. **Aquaculture**, v. 283, p. 92-96, 2008.

OLIVOTTO, I. et al. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, p. 135-166, 2011.

PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

PAYNE, M.; RIPPINGALE, R. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. **Aquaculture**, v. 188, p. 353-361, 2000.

PHAM, N. K.; LIN, J. The Effects of different feed enrichments on survivorship and growth of early juvenile longsnout seahorse, *Hippocampus reidi*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, p. 435-446, 2013.

PROJECT SEAHORSE. Annual Report, University of British Columbia, Canada, 20p., 2006.

RAISSY, M. et al. Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio strains* isolated from seafood. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 11, p. 618-626, 2012.

RODRIGUES-NETO, A. R. *Aspectos morfológicos do trato digestório do cavalo-marinho Hippocampus reidi (Ginsburg, 1933) [Percomorpha, gasterosteiformes, Syngnathidae]*. Monografia de Graduação, Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2000.

ROSA, I. M. L. et al. Fishers knowledge and seahorse conservation in Brazil. **Journal Ethnobiology Ethnomedicine**. v. 1, p. 1-15, 2005.

SARGENT, J. R.; MCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, v. 155, p. 117-127, 1997.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2005.

SEAHORSE, 2005. Disponível em: <http://www.seahorse.org/library/articles/diseaseguide.shtml>. Acesso em 05 de abril de 2016.

SHENG, J. et al. Effects of food, temperature and light intensity on the feeding behavior of three-spot juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus*. **Aquaculture**, v. 256, p. 596-607, 2006.

SILVEIRA, R. B. et al. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. **Zootaxa**, v. 3861, p. 317-332, 2014.

SREEPADA R. A.; DESAI U. M.; NAIK S. The plight of Indian seahorses: need for conservation and management. **Current Science**, v. 82, p. 377-378, 2002.

STOSKOPF, M. K. Fish Medicine. Philadelphia, U.S.A.: W.B. **Saunders Company**, 1993.

SUZER, C. et al. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 280, p. 140-145, 2008.

TALPUR, A. D. et al. Indigenous *Lactobacillus plantarum* as probiotic for larviculture of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758): Effects on survival, digestive enzyme activities and water quality. **Aquaculture**, v. 416-417, p. 173-178, 2013.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

VINCENT, A.C.J. The International Trade in Seahorses. **Traffic International**, 1996.

VU, M. T. T.; JEPSEN, P. M.; HANSEN, B. W. A comprehensive and precise quantification of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (Dana) for intensive live feed cultures using an automated ZooImage system. **Aquaculture**, v. 422-423, p. 225-231, 2014.

WANG, Y.B.; XU, Z. R. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. **Animal Feed Science Technology**, v. 127, p. 283-292, 2006.

WANG, Y.; LI, J.; LIN, J. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. **Aquaculture**, v. 281, n. 1-4, p. 1-4, 2008.

WILLADINO, L. et al. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. **Aquaculture**, v. 360-361, p. 10-16, 2012.

WILSON, M. J.; VINCENT, A. C. J. Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity. **Aquarium Sciences and Conservation**, v. 2, p. 179-196, 1998.

WONG, J. M.; BENZIE, J. A. H. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. **Aquaculture**, v. 228, n. 1-4, p.107-121, 2003.

WOODS, C. M. C. Improving initial survival in cultured seahorses, *Hippocampus abdominalis* Leeson, 1827 (Teleostei: Syngnathidae). **Aquaculture**, v. 190, p. 377-388. 2000.

WOODS, C. M. C. Effects of varying *Artemia* enrichment on growth and survival of juvenile seahorses, *Hippocampus abdominalis*. **Aquaculture**, v. 220. p. 537-548. 2003.

ZIAEI-NEJAD, S. et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, v. 252, p. 516-524, 2006.